

**L-Alanin-Aminotransferase von *Drosophila*
nigromelanica**

**Isolation, Charakterisierung und Aktivität
während der Ontogenese**

INAUGURAL-DISSERTATION

**ZUR ERLANGUNG
DER PHILOSOPHISCHEN DOKTORWÜRDE**

vorgelegt der
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
der Universität Zürich

von
MAX ROBERT SCHNEIDER
aus Basel

Begutachtet von
Herrn Prof. Dr. P. S. Chen

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**L-Alanin-Aminotransferase von *Drosophila*
*nigromelanica***

**Isolation, Charakterisierung und Aktivität
während der Ontogenese**

INAUGURAL-DISSERTATION

**ZUR ERLANGUNG
DER PHILOSOPHISCHEN DOKTORWÜRDE**

vorgelegt der
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
der Universität Zürich

von
MAX ROBERT SCHNEIDER
aus Basel

Begutachtet von
Herrn Prof. Dr. P. S. Chen



Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. P.S. Chen, danke ich
herzlich für die Leitung und Förderung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	3
	1. Versuchstiere und Zuchtbedingungen	3
	2. Messung der L-Alanin-Aminotransferasenaktivität	3
	3. Chromatographiemethoden	4
	4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	4
	5. Molekulargewichtsbestimmung	6
	6. Kinetische Untersuchungen	6
	7. Gewinnung von Enzymproben aus Ganztieren oder aus Organen zur Bestimmung der Enzymaktivität während der Entwicklung von <i>Drosophila nigro-</i> <i>melanica</i>	8
	8. Proteinbestimmung	9
III.	Resultate	10
	1. Reinigung der L-Alanin-Aminotransferase	10
	2. Partielle Charakterisierung der L-Alanin-Amino- transferase	16
	3. Kinetik	21
	4. Aktivität der L-Alanin-Aminotransferase während der Entwicklung von <i>Drosophila nigro-</i> <i>melanica</i>	41
IV.	Diskussion	51
	1. Reinigung der L-Alanin-Aminotransferase	51
	2. Charakterisierung der L-Alanin-Aminotransferase	52
	3. Aktivität der L-Alanin-Aminotransferase während der Entwicklung von <i>Drosophila nigro-</i> <i>melanica</i>	55
V.	Zusammenfassung	60
VI.	Literaturverzeichnis	62

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AAT	:	L-Alanin-Aminotransferase
EDTA	:	Aethylendiamintetraessigsäure
GDH	:	Glutamatdehydrogenase
LDH	:	Lactatdehydrogenase
MGW	:	Molekulargewicht
NAD	:	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
PAA	:	Polyacrylamid
pCMB	:	p-Chloromercuribenzoat
PLP	:	Pyridoxal-5'-phosphat
PMP	:	Pyridoxamin-5'-phosphat
PMS	:	Phenazinmethosulfat
SDS	:	Natriumdodecylsulfat
TCA	:	Trichloressigsäure

1. Einleitung

Insekten zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an freien Aminosäuren aus. (für eine zusammenfassende Darstellung siehe Chen, 1966 und 1971). Der Aminosäurestoffwechsel war demzufolge Gegenstand zahlreicher Arbeiten in der Insektenphysiologie. Wenig ist jedoch über die Struktur und Funktion der bei Säugern gut untersuchten Aminotransferasen bekannt, die eine Schlüsselstellung in der Synthese und im Abbau der Aminosäuren einnehmen.

Die aktivsten Aminotransferasen bei Insekten sind die L-Asparagin-Aminotransferase und die L-Alanin-Aminotransferase. Die intensivsten Studien über die Aktivität dieser Enzyme bei Insekten stammen von Kilby und Neville (1957), Mane und Mehrotra (1977) bei *Schistocerca*, Desai und Kilby (1958) bei *Calliphora*, Chen und Bachmann-Diem (1964) und Chen und Baker (1976) bei *Drosophila*.

Die Struktur der L-Alanin-Aminotransferase (L-Alanin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase, E.C. 2.6.1.2., abgekürzt AAT) wurde von Mane und Mehrotra (1976) untersucht. Sie fanden, dass bei *Schistocerca* die AAT im Cytosol hauptsächlich als Monomer und Dimer, in den Mitochondrien als Dimer vorkommt. Das Molekulargewicht des Monomers wurde auf 63'000 bestimmt. Bei Säugern wurden keine Untereinheiten des Enzyms gefunden (Jenkins und Saier, 1970; Segal und Matsuzawa, 1970). Ebenso erhielten Chen und Baker (1976) durch Gelfiltration keine Auftrennung des *Drosophila*-Enzyms in Untereinheiten. Bisher war jedoch keine AAT-Präparation aus Insekten rein genug, um sie einer elektrophoretischen Untersuchung zu unterziehen und einen schlüssigen Vergleich mit dem Säuger-Enzym zuzulassen.

Kinetische Daten liegen für die AAT aus verschiedenen Säugern vor (Hopper und Segal, 1962; Bulos und Handler, 1965; Gatehouse et al., 1967). Die Kinetik der Transaminierung durch die Insekten-AAT wurde bisher nur mit wenig gereinigten Enzymen untersucht (Donellan et al., 1974; Mane und Mehrotra, 1977; Chen und Baker, 1976). Insbesondere fehlt die Untersuchung der Reaktion in Richtung

der Bildung von L-Alanin und α -Ketoglutarensäure.

Die physiologische Bedeutung der AAT ist vielfältig. Die Funktionen in der Aufrechterhaltung des Aminosäurepools für die Proteinsynthese (Meister, 1965), in der Bereitstellung von Metaboliten für den Energiestoffwechsel (Sacktor, 1974) und in der Verbindung von Aminosäure-, Protein- und Kohlehydratstoffwechsel dürften zu den wichtigsten zählen.

Die vorliegende Arbeit umfasst die Isolation und Charakterisierung der AAT aus *Drosophila nigromelanica*. Um Hinweise über die physiologische Bedeutung der AAT in *Drosophila* zu gewinnen, wurde in einem weiteren Teil die Aktivität in ganzen Tieren, in den einzelnen Körperabschnitten und in verschiedenen Organen während der Entwicklung verfolgt.

II. Material und Methoden

1. Versuchstiere und Zuchtbedingungen

Drosophila nigromelanica wurde auf Standardfutter (Mais, Agar, Zucker und Hefe) bei 25°C gezüchtet. Unter diesen Bedingungen verpuppten sich die Larven 9 Tage nach der Eiablage, und die Imagines schlüpften nach 15 Tagen. Das Futter der adulten Tiere wurde alle drei Tage gewechselt.

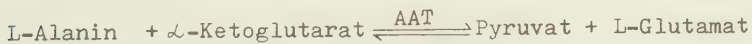
Die Weibchen blieben bis 5 Tage nach dem Schlüpfen virginell. Für Experimente mit virginellen Tieren wurden diese 2 Tage nach dem Schlüpfen separiert.

Für die Enzymisolation wurden 12-14-tägige, bei -90°C aufbewahrte Tiere verwendet.

Die Altersangaben in dieser Arbeit beziehen sich bei Larven und Puppen auf den Zeitpunkt der Eiablage, bei Adulttieren auf denjenigen des Schlüpfens.

2. Messung der L-Alanin-Aminotransferasenaktivität

Die Aktivität der AAT wurde, sofern nicht anders vermerkt, in Richtung der Pyruvat-Bildung nach der Methode von Grein und Pfeleiderer (1958) und mit den von Chen und Baker (1976) verwendeten Substratkonzentrationen gemessen. Ein Testansatz von 1 ml enthielt 100 µmol KPO₄-Puffer, pH 7,8; 20 µmol L-Alanin; 4 µmol L-Ketoglutarat; 0,1 µmol NADH; 2 U Lactatdehydrogenase; AAT und eine entsprechende Menge H₂O bidest., um ein Volumen von 1 ml zu erreichen. Die in diesem System ablaufenden Reaktionen lassen sich wie folgt darstellen:



Die Oxydation von NADH wurde photometrisch bei 340 nm mit einem Gilford-Spektralphotometer (Modell 2400-3) aufgezeichnet. Die Temperatur wurde mit einem Thermoprogrammer (Gilford 2527) bei 25°C konstant gehalten. Eine Enzymeinheit (U) ist definiert als der Umsatz von 1 μmol Substrat/min, die spezifische Aktivität als U/mg Protein unter den oben angegebenen Bedingungen. Zur Berechnung wurde für NADH ein molarer Extinktionskoeffizient von 6.22×10^3 (Horecker und Kornberg, 1948) verwendet. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe des Enzyms oder von L-Ketoglutarat (nur bei kinetischen Untersuchungen)..

3. Chromatographiemethoden

Alle chromatographischen Versuche wurden bei 4°C durchgeführt. Für die Säulenchromatographie wurden DEAE-Cellulose (DE-52, Whatman), Sephadex G-50 und G-150 (Pharmacia Fine Chemicals) und Hydroxylapatit (HTP, BIO-RAD) nach Angaben der Herstellerfirmen verwendet. Die Chromatographiedingungen sind im Kapitel "Resultate" aufgeführt. Die Eluate wurden in einem LKB-Fraktionensammler gesammelt und bei 280 nm mit einem Durchflussspektralphotometer (Uvicord II, LKB) gemessen.

4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

4.1. 7,5 %-Gel

Nach der Methode von Davis (1964) wurde ein 2 mm dickes Plattengel verwendet, welches aus einem Sammelgel mit einer Polyacrylamidkonzentration von 3 % und einem Trenngel von 7,5 % bestand. Die Höhe des Obergels betrug 2,9 cm, diejenige des Trenngels 9 cm. Vor dem Auftragen wurden die Proben im Verhältnis 2:1 mit einer 60 %-igen Saccharoselösung versetzt. Für die Auftrennung betrug die Stromstärke 12 mA in der ersten Stunde und 15 mA in den restlichen 3 Stunden.

4.2. 10 %-SDS-Gel

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach den Angaben von Lämmli (1970) in einem Plattengel mit gleichen Massen wie oben durchgeführt. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 2:1 mit Probenpuffer versetzt und 2 min in siedendem Wasser erhitzt. Die verwendete Stromstärke betrug 12 mA während der ersten Stunde und 18 mA während der restlichen 3 Stunden.

4.3. Proteinfärbung

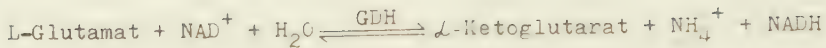
Die Gele wurden mit 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R (Sigma) in 50 % Methanol und 3,5 % Essigsäure über Nacht gefärbt und mit 50 % Methanol und 3,5 % Essigsäure mehrere Tage entfärbt (Weber und Osborn, 1969). Die Auswertung erfolgte mit einem Densitometer (Beckman, CDS).

4.4. Spezifische Färbung der L-Alanin-Aminotransferase nach elektrophoretischer Auftrennung

Die 7,5 %-Gele wurden nach der Auftrennung 30 min in 50 ml folgender Lösung inkubiert:

L-Alanin:	20	mM
α -Ketoglutarat:	4	mM
NAD:	10	mM
PMS:	0,5	mg
NBT:	5,5	mg
GDH (Boehringer, 10 mg/ml):	50	μ l

Der Nachweis der AAT erfolgte durch Umsetzung der durch die Transaminierung entstandenen Glutaminsäure mittels Glutamatdehydrogenase nach folgender Reaktion:



NADH reduziert über PMS NBT zum schwerlöslichen, violetten Formazan, welches im Gel ausfällt und so die AAT-Aktivität sichtbar macht.

5. Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmung wurde mittels Gelfiltration und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt.

Für die Gelfiltration wurde Sephadex G-150 verwendet. Die genauen Bedingungen der nach Andrews (1970) durchgeführten Versuche sind im Kapitel "Resultate" angegeben. Als Marker-Proteine wurden verwendet: Lactatdehydrogenase aus Kaninchenmuskel (Molekulargewicht 140'000, Boehringer), AAT aus Schweineherz (115'000, Boehringer), Rinderserumalbumin (68'000, Sigma), Ovalbumin (46'000, Sigma).

Gelzusammensetzung, Trennbedingungen, Probenaufbereitung und Proteinfärbung für die SDS-Gelelektrophorese wurden bereits beschrieben. Die Berechnung des Molekulargewichtes erfolgte nach Weber und Osborn (1970). Als Marker wurden folgende Proteine verwendet (MGW-Standard von BIO-RAD): Phosphorylase b (Molekulargewicht 90'000), Rinderserumalbumin (68'000), Ovalbumin (46'000), Carboanhydrase (29'000), Sojabohnen-Trypsininhibitor (20'100), Lysozym (14'300).

6. Kinetische Untersuchungen

Für die Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Vorwärtsreaktion wurden die gleichen Bedingungen wie unter Abschnitt 2 beschrieben verwendet. Substrat- sowie Inhibitorenlösungen wurden auf pH 7,8 eingestellt. Vor der Messung wurden sämtliche Komponenten mit Ausnahme von L-Ketoglutarat 10 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von L-Ketoglutarat gestartet.

Bei der Rückreaktion wurde das entstandene L-Ketoglutarat durch Kopplung der Reaktion mit Glutamatdehydrogenase und NADH gemessen:



Inhibition der Reaktion durch Glutamat wurde durch Verwendung einer hohen NH_4^+ -Konzentration verhindert (Bulos und Handler, 1965). Der Testansatz enthielt 100 μmol KPO_4 -Puffer, pH 7,8, 100 μmol neutralisiertes Ammoniumchlorid, 0,1 μmol NADH, 6 U Glutamatdehydrogenase, AAT, die angegebenen Mengen L-Glutamat, Pyruvat und, wo verwendet, die Inhibitoren in einem Volumen von total 1 ml. Alle Komponenten mit Ausnahme von Pyruvat wurden 10 min bei 25°C vorinkubiert. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Pyruvat.

Für die Bestimmung der Michaelis-Konstanten und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bei variierten Konzentrationen des einen Substrates und verschiedenen fixen Konzentrationen des Cosubstrates gemessen. Die scheinbaren Michaelis-Konstanten und die scheinbaren maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (V'_{max}) wurden durch doppelt reziproke Darstellung der Resultate nach Lineweaver-Burk (Lineweaver und Burk, 1934) erhalten. Die absoluten Michaelis-Konstanten und die absoluten relativen Reaktionsgeschwindigkeiten ergaben sich aus der Darstellung $1/V'_{\text{max}}$ gegen die reziproke Cosubstratkonzentration (Florini und Vestling, 1957). Der Ordinatenabschnitt einer solchen Darstellung entspricht $1/V_{\text{max}}$, der Abszissenabschnitt $-1/K_m$.

Um die Produktinhibitionskonstanten zu bestimmen, wurde die Konzentration der Ketosäure variiert bei einer konstanten Konzentration der Cosubstrat-Aminosäure und verschiedenen fixen Konzentrationen der Produkt-Aminosäure. Steigungen und Ordinatenabschnitte der durch die Lineweaver-Burk Darstellung erhaltenen Geraden wurden in Abhängigkeit von der Produkt-Aminosäurekonzentration

tration abgetragen. Die Ableitung der Konstanten aus dieser Darstellung ist im Kapitel "Resultate" beschrieben.

Die Inhibitionskonstanten für die Substratanaloga (Maleat und L-Aminobutyrat) wurden aus der analogen Darstellung abgeleitet. K_{II} und K_{IS} bezeichnen die Inhibitorenkonzentrationen, bei denen die Werte für die Ordinatenabschnitte oder die Steigungen der Geraden verdoppelt werden (Cleland, 1969). K_{II} ist die Dissoziationskonstante für den Enzym-Pyridoxal-Inhibitor Komplex, K_{IS} für den Enzym-Pyridoxamin-Inhibitor Komplex. Für den Inhibitionstypus wurden die Bezeichnungen kompetitiv, unkompetitiv und nichtkompetitiv verwendet, je nachdem, ob die Steigung, der Ordinatenabschnitt oder beides eine Funktion der Inhibitor-konzentration ist.

7. Gewinnung von Enzymproben aus Ganztieren oder aus Organen zur Bestimmung der Enzymaktivität während der Entwicklung von *Drosophila nigromelanica*

Ganze Tiere oder Teile von ganzen Tieren wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß in 200 µl eiskalter, gepufferter Ringerlösung (pH 7,8, 36 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und 11 g Na_2HPO_4 in 1 l Insektenringerlösung) mit einem kleinen Glasmörser zerstoßen und anschließend mit einem Sonifier (Branson) bei 40 kHz 2-3 Sekunden homogenisiert. Nach Zugabe von weiteren 100 µl Ringerlösung wurden die Proben wieder in Eiswasser gekühlt, so dass sie nie eine Temperatur von 10°C überschritten.

Die Organe wurden in einem Tropfen eiskalter Ringerlösung herausseziert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert, welches 100 µl gepufferte Ringerlösung enthält.

Die Homogenisation erfolgte durch Ultraschallbehandlung wie oben beschrieben.

Nach der Ultraschallbehandlung wurden die Proben 5 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Vom Ueberstand wurde je ein Aliquot für die Messung der Enzymaktivität und der Proteinkonzentration verwendet.

8. Proteinbestimmung

Es wurde die Methode von Lowry et al. (1951) angewandt. Dabei wurde Na-K-Tartrat durch das stabilere Na-Citrat (Eggstein et al., 1955) ersetzt. Als Standard diente Rinderserumalbumin. Für die Proteinbestimmungen in Zusammenhang mit der Enzymisolation wurden die Proteine zuerst durch 6 % TCA präzipitiert und dann in 0,1 n NaOH aufgenommen.

III. Resultate

1. Reinigung der L-Alanin-Aminotransferase

1.1. Extraktion

40 g Fliegen von *Drosophila nigromelanica* wurden in einem Labormixer 5 min in 400 ml Puffer I (KPCl_4 , 10 mM, pH 7,5; EDTA, 1 mM; 2-Mercaptoäthanol, 10 mM) bei niedrigster Tourenzahl homogenisiert. Das Homogenat wurde 15 min bei 12'000 g zentrifugiert und der Ueberstand anschliessend durch eine Müllergaze filtriert, um feine, schwimmende Cuticulateile zu entfernen.

1.2. Ammoniumsulfat-Fällung

Zur trüben Extraktlösung (400 ml) wurden nun langsam unter Rühren 96,8 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zugegeben. Der Niederschlag wurde nach 30 min mit 12'000 g abzentrifugiert und verworfen. Der Ueberstand wurde mit weiteren 127,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt, der Niederschlag wie oben abzentrifugiert und in 20 ml Puffer I aufgenommen, wobei die Lösung trüb blieb.

1.3. Chromatographie über Sephadex G-50

Zur Entsalzung wurde die Lösung über eine Säule (2,5 x 60 cm) mit Sephadex G-50 in Puffer I chromatographiert. Der Durchfluss betrug 60 ml/h. Ein grosser Teil der ungelösten Anteile und der Pigmentfarbstoffe blieb in der Säule zurück, während das Enzym mit der ersten Proteinfraktion in einem Volumen von 86 ml eluierte. Das Eluat wurde mit einer angesäuerten BaCl_2 -Lösung auf Sulfatfreiheit getestet.

1.4 Chromatographie über DEAE-Cellulose I

Die gelbe, nur noch wenig trübe Enzymlösung wurde auf eine mit Puffer I aequilibrierte DEAE-Cellulose-Säule (2,5 x 20 cm) aufgetragen und mit 400 ml Puffer I gespült. Die noch zurückgebliebenen trübenden Anteile wurden dabei ausgewaschen. Das Enzym konnte mit Puffer II (KPO_4 , 10 mM, pH 7,5; 2-Mercapto-Äthanol, 10 mM; EDTA, 1 mM; L-Alanin, 10 mM; L-Prolin, 1 mM), welcher 0,05 mol NaCl/l enthielt, abgelöst werden. Die enzymhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, was ein Volumen von 43 ml ergab, und mit 24,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt. Nach 60 min wurde mit 12'000 g 15 min lang zentrifugiert und das erhaltene Sediment in 4 ml Puffer II aufgenommen.

1.5. Chromatographie über Sephadex G-150

Die Bedingungen und das Resultat der Chromatographie über Sephadex G-150 können aus Abb. 1 entnommen werden. Das Enzym erschien mit dem ersten Peak. Die Fraktionen 52-60 wurden vereinigt, was ein Volumen von 43 ml ergab.

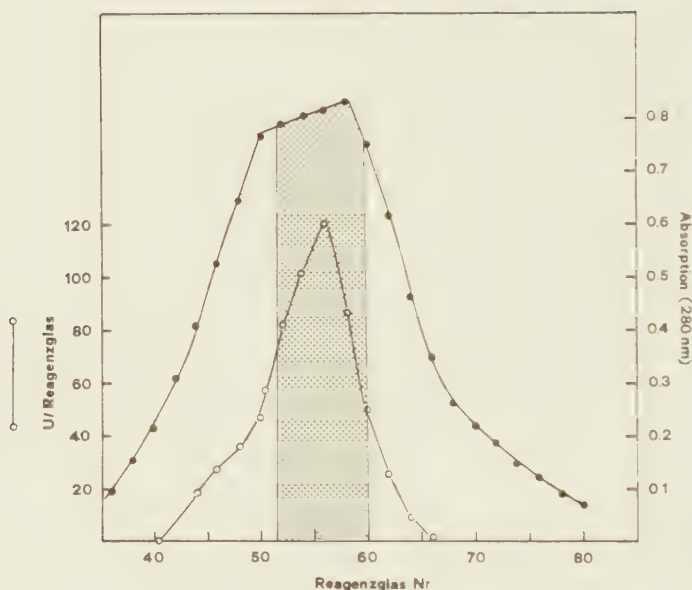


Abb. 2: Reinigung der L-Alanin-Aminotransferase über Sephadex G-150

Die nach Chromatographie über eine DEAE-Säule und durch Konzentration mittels $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung gewonnene Enzym-lösung (Abschnitt 1.4.) wurde über Sephadex G-150 (2,5 x 110 cm) bei einem Durchfluss von 34 ml/h chromatographiert. Pro Fraktion wurden 4,8 ml gesammelt.

 : vereinigte Fraktionen

1.6. Chromatographie über DEAE-Cellulose II

Nach der Chromatographie über Sephadex G-150 erfolgte eine zweite Chromatographie über eine DEAE-Säule. Die Elution wurde mittels eines linearen NaCl-Gradienten (0-0,08 M, 300 ml/Kammer) durchgeführt. Die Versuchsbedingungen und das Elutionsprofil können aus Abb.2 entnommen werden. Die AAT eluierte bei einer NaCl-Konzentration von 0,022 - 0,048 mol/l. Die Fraktionen 40-60 wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration von 112 ml auf 21,5 ml eingedickt.

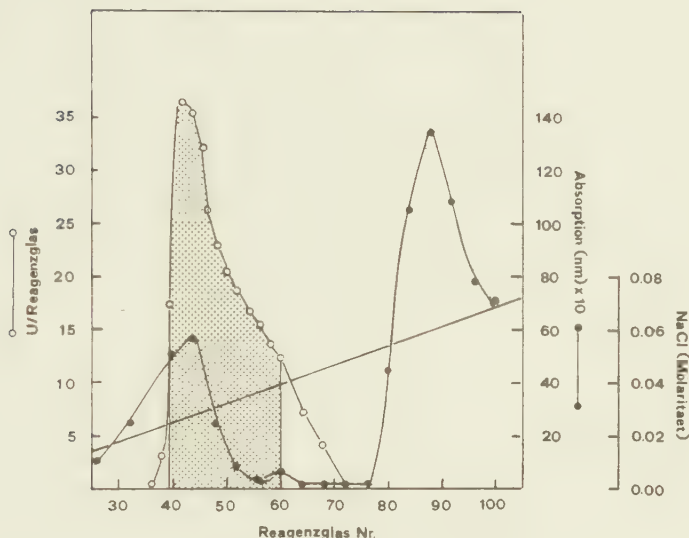


Abb. 2: Reinigung der L-Alanin-Aminotransferase über DEAE-Cellulose

Die nach Chromatographie über Sephadex G-150 erhaltene AAT-Lösung wurde auf eine mit Puffer II aequilibrierte DEAE-Säule (2,5 x 10 cm) aufgetragen und mit 200 ml Puffer II gespült. Die Elution erfolgte mit einem linearen NaCl-Gradienten (0 - 0,08 mol NaCl/l Puffer, 300 ml/Kammer). Es wurden Fraktionen von 5,3ml gesammelt, der Durchfluss betrug 64 ml/h.

☐ : vereinigte Fraktionen

1.7. Chromatographie über Hydroxylapatit

Als letzter Reinigungsschritt erfolgte eine Chromatographie über Hydroxylapatit. Die AAT wurde mittels eines linearen KPO_4 -Gradienten (0,01 M - 0,2 M, 150 ml/Kammer) eluiert. Die genauen Chromatographiebedingungen und das Elutionsprofil sind aus Abb. 3 zu entnehmen. Das Enzym eluierte bei einer KPO_4 -Konzentration von 0,08 - 0,11 mol/l. Die Fraktionen 24-27 wurden **vereinigt**, mittels Ultrafiltration auf 2,31 ml eingengt und bei 4°C aufbewahrt.

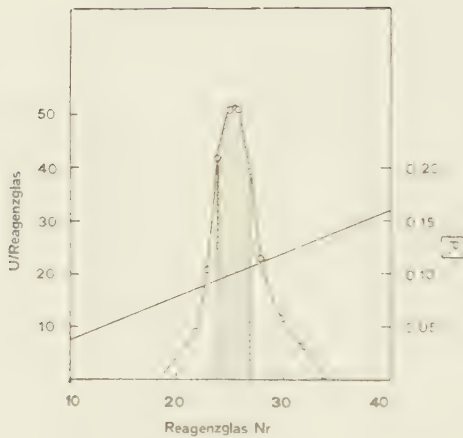


Abb. 5: Reinigung der L-Alanin-Aminotransferase über Hydroxyl-
appatit

Die nach Abschnitt 1.6. gewonnene Enzymlösung wurde auf eine mit Puffer II aequilibrierte Hydroxylappatit-Säule (1,2 x 10 cm) aufgetragen. Nachdem mit 25 ml Puffer II gespült worden war, erfolgte die Elution mittels eines linearen KPO_4 -Gradienten (0,01 - 0,20 M, 150 ml/ Kammer), wobei beide Puffer im pH und in den Zusätzen Puffer II entsprachen.

⊞ : vereinigte Fraktionen

1.8 Reinigungsprotokoll

Die Ergebnisse der einzelnen Reinigungsschritte sind in Tab. 1 zusammengefasst. Die geringe Ausbeute von 9,4 % der Anfangsaktivität ist in Anbetracht der vielen Schritte nicht erstaunlich. Die AAT ist besonders bei starker Verdünnung sehr instabil. Demzufolge ist der Verlust bei den letzten Reinigungsschritten, die eine solche nach sich ziehen, am grössten.

Die erreichte spezifische Aktivität von 486 U/mg stimmt gut mit den für reine AAT von Säugern erhaltenen Ergebnissen anderer Autoren überein (vergl. dazu Abschnitt 1 im Kapitel "Diskussion").

Tab. 1: Reinigung der L-Alanin-Aminotransferase

Die Einzelheiten der Fraktionierung sind im Text aufgeführt.

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	total Aktivität (U)	total Protein (mg)	spez. Akt. (U/mg)	Reinigungs- faktor	Ausbeute (%)
1. Rohextrakt	400	1672	4146	0,4	1	100
2. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung u. Sephadex G-50	86	1396	421	3,3	8	83,5
3. DEAE-Cellulose I	43	1237	52,9	23	58	74
4. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung u. Sephadex G-150	43	778	25,1	31	77	47,5
5. DEAE-Cellulose II u. Ultrafiltration	21,5	510	2,6	196	490	30,5
6. Hydroxylappatit u. Ultrafiltration	2,30	157	0,32	486	1215	9,4

2. Partielle Charakterisierung der L-Alanin-Aminotransferase

2.1. Stabilität

Die gereinigte AAT wurde in einer Konzentration von ca. 0,15 mg/ml bei 4°C in KPO_4 -Puffer (0,1 M, pH 7,5), der alle Zusatzkomponenten von Puffer II enthielt, aufbewahrt. Nach 2 Monaten betrug die Aktivität noch 80 % der Ausgangsaktivität. Nach Zugabe von 10 mg Rinderserumalbumin/ml blieben 91 % der Ausgangsaktivität erhalten. Einfrieren bei -22°C führte in beiden Fällen zu einem Aktivitätsverlust von über 50 %.

2.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die gereinigte AAT wurde mittels Polyacrylamid- und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. Aus Abb. 4a ist das Ergebnis einer PAA-Elektrophorese in einem 7,5 %-Gel ersichtlich. Es konnten nur ganz schwache Verunreinigungen festgestellt werden, die auf der Photographie nicht zu sehen sind. Abb. 4b zeigt mittels einer für die AAT spezifischen Färbung, dass die Stelle der AAT-Aktivität mit der Hauptbande in Abb. 4a übereinstimmt. Die densitometrische Auswertung des in Abb. 4a gezeigten Gels ergab für die Verunreinigungen nur einen geringen Anteil (Abb. 5).

Die Elektrophorese in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel ergab ebenfalls nur geringe Verunreinigungen (Abb. 6). Die densitomerische Auswertung ist in Abb. 7 dargestellt.

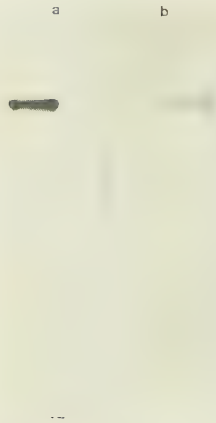


Abb. 4: Polyacrylamid-Gelelektrophorese der L-Alanin-Aminotransferase

Die Auftrennung erfolgte in einem 7,5 %-Gel. Die spezifische Aktivität der Probe betrug 486 U/mg Protein, 5 µg Protein (2,4 U) wurden aufgetragen.

- a: Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R
b: Zymogramm der AAT

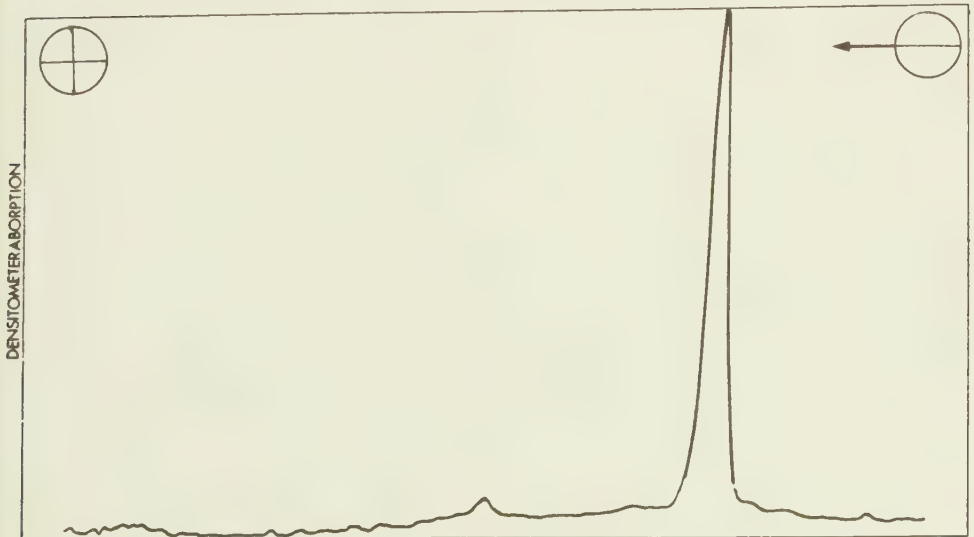


Abb 5: Densitometrische Auswertung des in Abb. 4a abgebildeten Gels



Abb. 6: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der L-Alanin-Amino-transferase

Die Auftrennung erfolgte in einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel. Die spezifische Aktivität der Probe betrug 486 U /mg Protein. Aufgetragen wurden 7 μ g Protein.

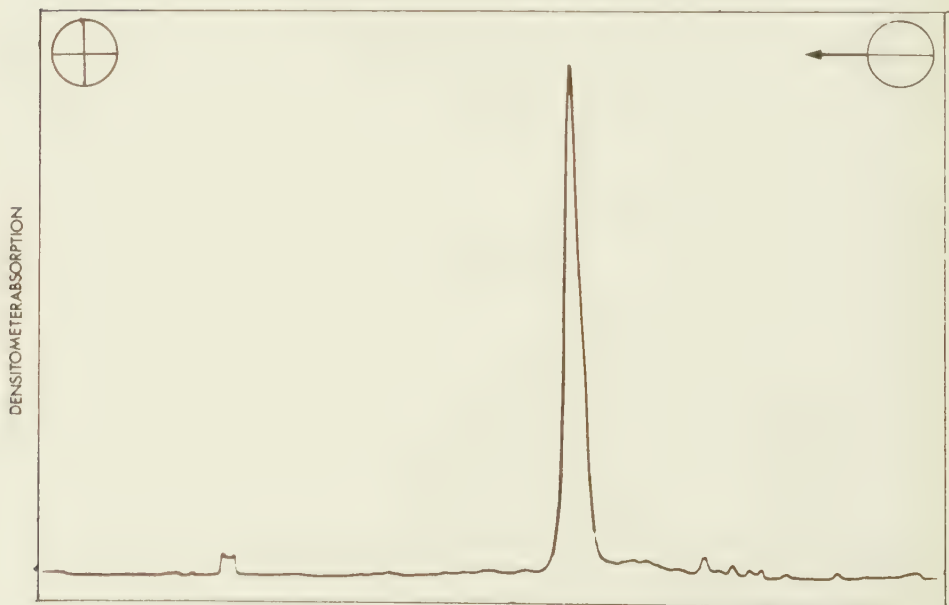


Abb. 7: Densitometrische Auswertung des in Abb. 6 gezeigten SDS-Polyacrylamidgels

2.3. Molekulargewichtsbestimmung

2.3.1. Molekulargewichtsbestimmung mittels Sephadex-Gelchromatographie

Mittels Chromatographie über Sephadex G-150 wurde ein scheinbares Molekulargewicht von 113'000 für die AAT errechnet. Chromatographiebedingungen und die verwendeten Marker sind in Abb. 8 aufgeführt.

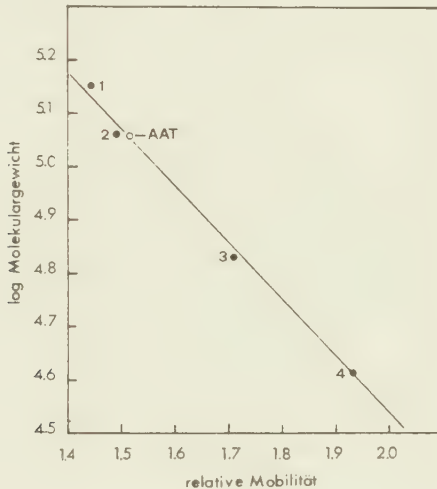


Abb. 8: Molekulargewichtsbestimmung mittels Chromatographie über Sephadex G-150

Auf eine Sephadex G-150 Säule (1,2 x 90 cm) wurden die Marker und die AAT in einem Volumen von 0,5 ml in einer 20 %-igen Saccharose-Lösung durch Unterschichten aufgetragen und mit Puffer I, welcher 0,1 mol NaCl/l enthielt, bei einem Arbeitsdruck von 20 cm chromatographiert. Für jeden Marker und die AAT erfolgte eine separate Chromatographie. Es wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt. Marker: 1 LDH aus Kaninchenmuskel, 2 AAT aus Schweineherz, 3 Rinderserumalbumin, 4 Ovalbumin.

2.3.2. Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ergab für die AAT ein Molekulargewicht von 56'000 (Abb. 9 und 10). Mittels Chromatographie über Sephadex G-150 wurde das doppelte scheinbare Molekulargewicht erhalten. Es kann daraus geschlossen werden, dass das native Enzym aus zwei Untereinheiten von gleichem Molekulargewicht besteht.

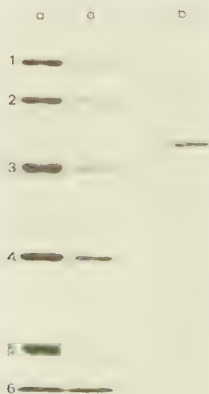


Abb. 9: Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- a: Auftrennung von je 5 μ g und 2,5 μ g folgender Vergleichsproteine: 1 Phosphorylase b, 2 Rinderserumalbumin, 3 Ovalbumin, 4 Carboanhydrase, 5 Sojabohnen-Trypsin-inhibitor, 6 Lysozym.
 b: 2 μ g AAT aus *Drosophila nigromelanica*

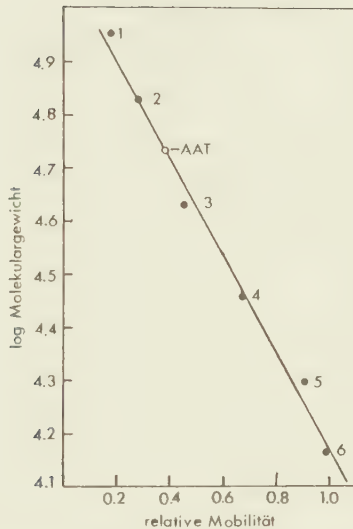


Abb. 10: Eichkurve der Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Vergleichsproteine wurde die gleiche Numerierung wie in Abb. 9 verwendet.

3. Kinetik

3.1. Effekt hoher Substratkonzentrationen

Bulos und Handler (1965) fanden für die AAT des Rindes Substratinhibition bei hohen Aminosäurekonzentrationen. In Uebereinstimmung damit stehen die Resultate, die in Abb. 11 dargestellt sind. Die Aminosäuren wirken inhibitorisch bei Konzentrationen von 20 mal der scheinbaren Michaelis-Konstanten von Alanin und 10 mal derselben von Glutaminsäure. Hingegen wurde keine Substratinhibition durch die Ketosäuren beobachtet, obwohl Konzentrationen bis 100 mal ihrer scheinbaren Michaelis-Konstanten verwendet wurden.

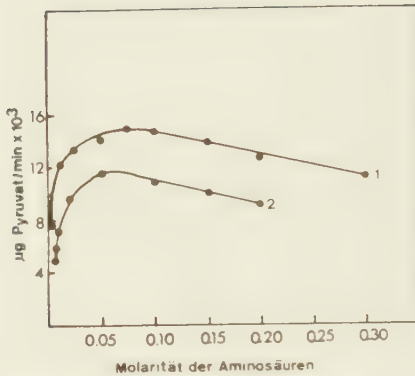
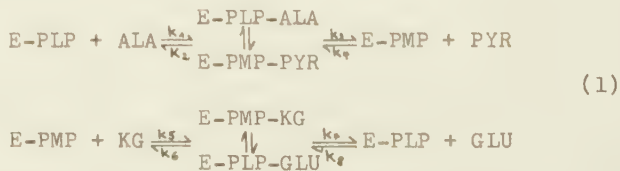


Abb. 11: Effekt hoher Konzentration der Substrataminosäuren

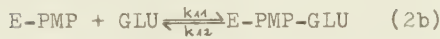
Kurve 1: Alanin als Substrat, α -Ketoglutar säure 1 mM
 Kurve 2: Glutaminsäure als Substrat, Pyruvat 1 mM

3.2 Bestimmung der Michaelis-Konstanten

Zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten wurden die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei variablen Konzentrationen des einen Substrates und verschiedenen fixen Konzentrationen des Cosubstrates gemessen. Die Lineweaver-Burk Darstellungen dieser Experimente (Abb. 12 und 14) zeigen, dass die erhaltenen Geraden parallel verlaufen. Dies steht in Uebereinstimmung mit dem für die Aminotransferasen angenommenen Ping-Pong Mechanismus. Gleichung 1 erläutert den minimalen Reaktionsmechanismus:



Die Substrathemmung (Abb. 11) kann mit diesem Mechanismus nicht erklärt werden. Zusätzlich wurde deshalb von Bulos und Handler (1965) die Bildung abortiver Komplexe zwischen den Aminosäuren und der Pyridoxaminform des Enzyms angenommen:



Die Gesamtgeschwindigkeitsgleichung für den vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus, nach der Methode von King und Altman (1956) durch Bulos und Handler (1965) abgeleitet, zeigt folgende Form:

$$v = \frac{V_F V_R [(ALA)(KG) - (PYR)(GLU)/K_{eq}]}{V_R K_{ALA}(KG) + V_R K_{KG}(ALA) + \frac{V_F K_{PYR}(GLU)}{K_{eq}} + \frac{V_F K_{GLU}(PYR)}{K_{eq}} + \frac{V_F}{K_{eq}} (PYR)(GLU) + V_R (KG)(ALA) + \frac{V_R K_{KG}(KG)(GLU)}{K_i^{GLU}} + \frac{V_R K_{KG}(ALA)(PYR)}{K_i^{PYR}} + \frac{V_R K_{KG}(ALA)^2}{K_{IA}} + \frac{V_F K_{PYR}(GLU)^2}{K_{eq} K_{IG}} + \frac{V_R K_{KG}(ALA)(GLU)}{K_{RG}}} \quad (3)$$

V_F und V_R bedeuten die maximale Geschwindigkeit der Vorwärts- bzw. der Rückwärtsreaktion, (ALA) , (KG) , (PYR) und (GLU) die Konzentrationen von L-Alanin, α -Ketoglutarat, Pyruvat und L-Glutaminsäure, K_{ALA} , K_{KG} , K_{PYR} und K_{GLU} die Michaelis-Konstanten, K_i^{ALA} , K_i^{KG} , K_i^{PYR} und K_i^{GLU} die Produktinhibitionskonstanten, K_{IA} und K_{IG} die Dissoziationskonstanten der (E-PMP-ALA)- und (E-PMP-GLU)-Komplexe. K_{RG} ist eine komplexe Funktion von K_{IA} , K_{IG} , K_i^{PYR} , K_i^{ALA} , K_{PYR} und K_{GLU} . K_{eq} ist die Gleichgewichtskonstante der Reaktion $ALA + KG \rightleftharpoons PYR + GLU$. Sie wurde für die folgenden Berechnungen durch die Haldane-Beziehung ersetzt.

Bei der Verwendung von L-Alanin und α -Ketoglutarat als Substrate reduziert sich Gleichung 3 zu Gleichung 4, indem alle Ausdrücke, die Produkte enthalten, gleich Null gesetzt werden:

$$\frac{1}{v_F} = \frac{K_{KG}}{V_F} \left[1 + \frac{(ALA)}{K_{IA}} \right] \frac{1}{(KG)} + \left[1 + \frac{K_{ALA}}{(ALA)} \right] (1/v_F) \quad (4a)$$

$$\frac{1}{v_R} = \frac{K_{ALA}}{V_F} \left[\frac{1}{(ALA)} \right] + \frac{K_{KG}}{V_F K_{IA}} \left[\frac{(ALA)}{(KG)} \right] + 1 + \left[\frac{K_{KG}}{(KG)} \right] + 1/v_F \quad (4b)$$

Die Darstellung von $1/v_F$ gegen die reziproke Konzentration von α -Ketoglutaratsäure bei einer fixen Konzentration von L-Alanin muss demnach linear sein. Die Steigung einer Geraden beträgt

$$\frac{K_{KG}}{v_F} \left[1 + \frac{(ALA)}{K_{IA}} \right]$$

und der Ordinatenabschnitt

$$\left[1 + \frac{K_{ALA}}{(ALA)} \right] (1/v_F).$$

Bei einer L-Alaninkonzentration von weniger als 10 % von K_{IA} sollte die Beeinflussung der Steigung durch L-Alanin sehr gering sein, und die Geraden sollten bei verschiedenen L-Alaninkonzentrationen parallel erscheinen. Eulas und Handler (1966) bestimmten für K_{IA} 0,47 M. Die von uns verwendeten Konzentrationen für L-Alanin liegen deutlich unter 10 % dieses Wertes und die Geraden verlaufen erwartungsgemäss parallel (Abb. 12).

Die aus Abb. 12 erhaltenen Ordinatenabschnitte sollten linear von der Konzentration des Cosubstrates (L-Alanin) abhängen, was mit Abb. 13 übereinstimmt. Der Ordinatenabschnitt in dieser Abbildung entspricht $1/v_F$, die Steigung der Geraden K_{ALA}/V_F . Daraus lassen sich K_{ALA} und V_F errechnen.

$$K_{ALA} = 5,20 \text{ mM}, \quad V_F = 0,026 \text{ } \mu\text{mol/min}$$

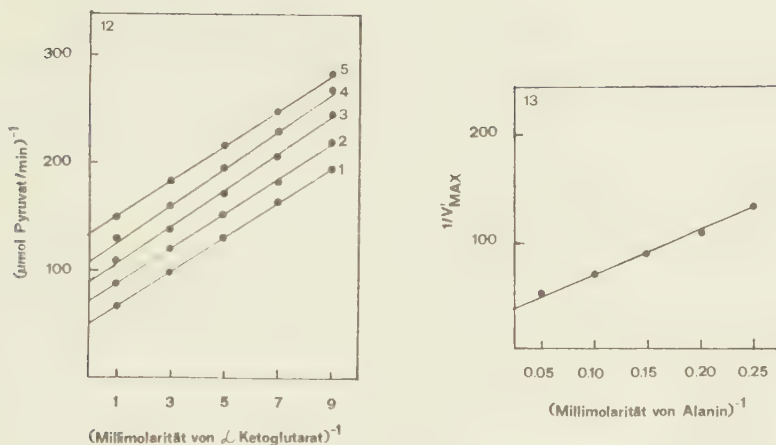


Abb. 12: Lineweaver-Burk Darstellung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von variierten Konzentrationen von α -Ketoglutaratsäure bei verschiedenen fixen Konzentrationen von L- Alanin

Die Konzentrationen der α -Ketoglutaratsäure wurden von 0,111 - 1 mM variiert. Die L-Alaninkonzentrationen betrugen: Gerade 1, 20 mM; Gerade 2, 6,66 mM; Gerade 3, 4,00 mM; Gerade 4, 2,85 mM; Gerade 5, 2,22 mM.

Abb. 13: Darstellung der relativen maximalen Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der reziproken L-Alaninkonzentration

Die Lineweaver-Burk Darstellung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der L-Alaninkonzentrationen bei verschiedenen fixen Konzentrationen von α -Ketoglutaratsäure ergab eine Familie von parallelen Geraden. Nach Gleichung 4b sollten bei hohen L-Alanin- oder niedrigen α -Ketoglutaratsäurekonzentrationen keine Geraden erhalten werden. Bei unseren experimentellen Bedingungen kann der unterstrichene Ausdruck jedoch vernachlässigt werden, wodurch 4 b zu einer linearen Gleichung reduziert wird. $1/v_F$ hängt demnach linear von $1/ALA$ ab, was experimentell auch gefunden wurde (Abb. 14). Die relativen

maximalen Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten (Ordinatenabschnitte in Abb. 14) wurden gegen die reziproken Konzentrationen des fixen Cosubstrates abgetragen (Abb. 15). Der Ordinatenabschnitt der erhaltenen Geraden entspricht $1/V_F$, die Steigung K_{KG}/V_F . Die Berechnung der Konstanten ergab:

$$K_{KG} = 0,43 \text{ mM}, \quad V_F = 0,025 \text{ } \mu\text{mol/min}$$

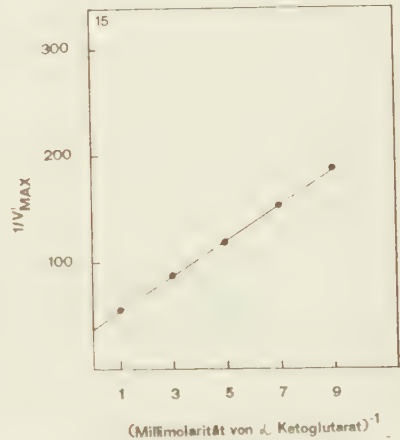
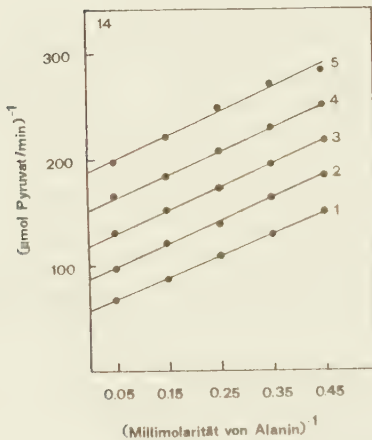


Abb. 14: Lineweaver-Burk Darstellung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von variierten L-Alaninkonzentrationen bei verschiedenen fixen Konzentrationen der L-Ketoglutaratsäure

Die L-Alaninkonzentrationen wurden von 2,22 - 20 mM variiert. Die Konzentrationen von L-Ketoglutaratsäure betrugen: Gerade 1, 1 mM; Gerade 2, 0,333 mM; Gerade 3, 0,200 mM; Gerade 4, 0,142 mM; Gerade 5, 0,111 mM.

Abb. 15: Darstellung der relativen maximalen Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der reziproken Konzentration der L-Ketoglutaratsäure

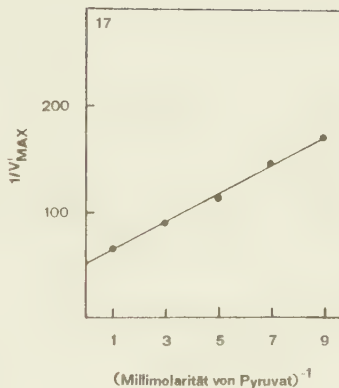
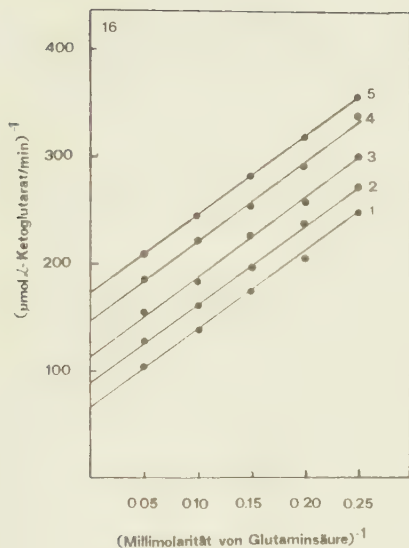


Abb. 16: Lineweaver-Burk Darstellung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von variierten L-Glutaminsäurekonzentrationen bei verschiedenen fixen Konzentrationen von Pyruvat

Die L-Glutaminsäurekonzentrationen wurden von 4 mM - 20 mM variiert. Die Konzentrationen von Pyruvat betrugen: Gerade 1, 1 mM; Gerade 2, 0,333 mM; Gerade 3, 0,200 mM; Gerade 4, 0,142 mM; Gerade 5, 0,111 mM.

Abb. 17: Darstellung der relativen maximalen Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der reziproken Pyruvatkonzentration

Analoge Überlegungen führten zur Berechnung von K_{GLU} und K_{PYR} . In Abb. 16 und 18 sind die Ergebnisse der Messungen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei variierten Substratkonzentrationen und verschiedenen fixen Cosubstratkonzentrationen festgehalten. Die Lineweaver-Burk Darstellung der Resultate ergab erwartungsgemäss eine Familie von parallelen Geraden, deren Ordinatenabschnitte linear von den reziproken Cosubstratkonzentrationen abhängen (Abb. 17 und 19). Die Berechnung der Konstanten ergab:

$$K_{\text{GLU}} = 14,0 \text{ mM}, \quad V_R = 0,020 \text{ } \mu\text{mol/min}$$

$$K_{\text{PYR}} = 0,25 \text{ mM}, \quad V_R = 0,19 \text{ } \mu\text{mol/min}$$

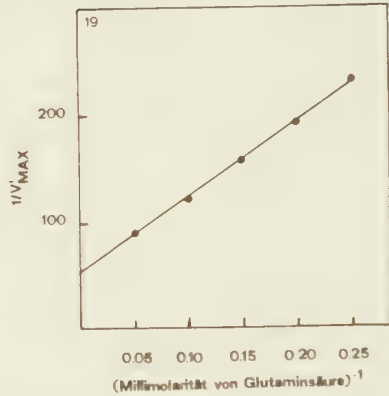
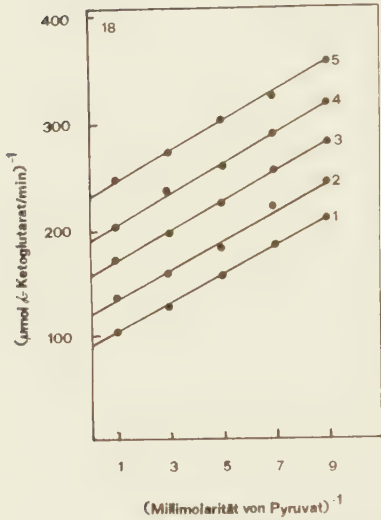


Abb. 18: Lineweaver-Burk Darstellung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von variierten Pyruvatkonzentrationen bei verschiedenen fixen Konzentrationen von L-Glutaminsäure

Die Pyruvatkonzentrationen wurden von 0,111 mM - 1 mM variiert. Die L-Glutaminsäurekonzentrationen betrugen: Gerade 1, 20 mM; Gerade 2, 10 mM; Gerade 3, 6,66 mM; Gerade 4, 5 mM; Gerade 5, 4 mM.

Abb. 19: Darstellung der relativen maximalen Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der reziproken L-Glutaminsäurekonzentration

3.3. Kinetik der Produktinhibition

Liegen zu Beginn der Reaktion L-Glutaminsäure bei der Vor-

wärts- und L-Alanin bei der Rückwärtsreaktion im Reaktionsgemisch vor, ergeben sich aus Gleichung 3 die Gleichungen 5 und 6.

$$\begin{aligned} \frac{1}{v_F} = & \frac{K_{ALA}}{v_F} \left[1 + \frac{(GLU)}{K_i^{glu}} + \frac{K_i^{kg}(GLU)}{(KG)K_i^{glu}} \right] \frac{1}{(ALA)} + \frac{K_{KG}(ALA)}{v_F(KG)K_{IA}} + \\ & + \frac{K_{ALA}K_i^{kg}(GLU)^2}{v_F(ALA)(KG)K_i^{glu}K_{IG}} + 1 + \left[\frac{K_{KG}}{(KG)} \right] (1/v_F) + \frac{K_{KG}(GLU)}{v_F(KG)K_{RG}} \end{aligned} \quad (5a)$$

$$\begin{aligned} \frac{1}{v_F} = & \frac{K_{KG}}{v_F} \left[1 + \frac{K_{ALA}K_i^{kg}(GLU)}{K_{KG}(ALA)K_i^{glu}} + \frac{(ALA)}{K_{IA}} \right] \frac{1}{(KG)} + \frac{K_{KG}(GLU)}{v_F(KG)K_{RG}} + \\ & + \frac{K_{ALA}K_i^{kg}(GLU)^2}{v_F(ALA)K_i^{glu}K_{IG}} + \left[1 + \frac{K_{KG}}{(ALA)} + \frac{K_{ALA}(GLU)}{(ALA)K_i^{glu}} \right] 1/v_F \end{aligned} \quad (5b)$$

$$\begin{aligned} \frac{1}{v_R} = & \frac{K_{GLU}}{v_R} \left[1 + \frac{(ALA)}{K_i^{ala}} + \frac{K_i^{pyr}(ALA)}{(PYR)K_i^{ala}} \right] \frac{1}{(GLU)} + \frac{K_{PYR}(GLU)}{v_R(PYR)K_{IG}} + \\ & + \frac{K_{GLU}K_i^{pyr}(ALA)^2}{v_R(PYR)(GLU)K_i^{ala}K_{RG}} + 1 + \left[\frac{K_{PYR}}{(PYR)} \right] (1/v_R) + \frac{K_{GLU}K_i^{pyr}(ALA)}{v_R(PYR)K_i^{ala}K_{RG}} \end{aligned} \quad (6a)$$

$$\begin{aligned} \frac{1}{v_R} = & \frac{K_{PYR}}{v_R} + 1 + \left[\frac{K_{GLU}K_i^{pyr}(ALA)}{(GLU)K_{PYR}K_i^{ala}} + \frac{(GLU)}{K_{IG}} \right] \frac{1}{(PYR)} + \frac{K_{GLU}K_i^{pyr}(ALA)}{v_R((PYR)K_i^{ala}K_{RG}} + \\ & + \frac{K_{GLU}K_i^{pyr}(ALA)^2}{v_R(PYR)(GLU)K_i^{ala}K_{IA}} + \left[1 + \frac{K_{GLU}}{(GLU)} + \frac{K_{GLU}(ALA)}{(GLU)K_i^{ala}} \right] (1/v_R) \end{aligned} \quad (6b)$$

Die Gleichungen 5a und 6a können um die unterstrichenen Ausdrücke reduziert werden, da diese bei den verwendeten experimentellen Bedingungen vernachlässigbar klein werden. Die Abbildungen 20 und 21 zeigen, dass die Produktamino-säuren gegenüber den Substratamino-säuren kompetitiv hemmen. Dies steht in Uebereinstimmung mit den Gleichungen 5a und 6a, da die Ausdrücke für die Ordinatenabschnitte nur konstante Grössen enthalten.

Die Gleichungen 5b und 6b können aus oben erwähnten Gründen ebenfalls um die unterstrichenen Ausdrücke reduziert werden. Die Produktamino-säuren sollten demnach gegenüber den Ketosäuren nichtkompetitiv hemmen, da die Ausdrücke für Steigung und Ordinatenabschnitt die Konzentrationen der Produktamino-säure enthalten. Die in Abb. 22 und 24 dargestellten Resultate bestätigen diese Erwartung.

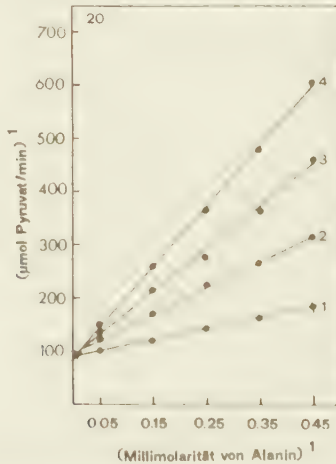


Abb. 20: Produktinhibition der Vorwärtsreaktion durch L-Glutaminsäure

Lineweaver-Burk Darstellung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von variierten L-Alaninkonzentrationen bei verschiedenen fixen Konzentrationen von L-Glutaminsäure. Die Konzentrationen von L-Ketoglutarat wurde bei 0,333 mM konstant gehalten. Die L-Glutaminsäurekonzentrationen betragen: Gerade 1, 0 mM; Gerade 2, 3,33 mM; Gerade 3, 6,66 mM; Gerade 4 10 mM.

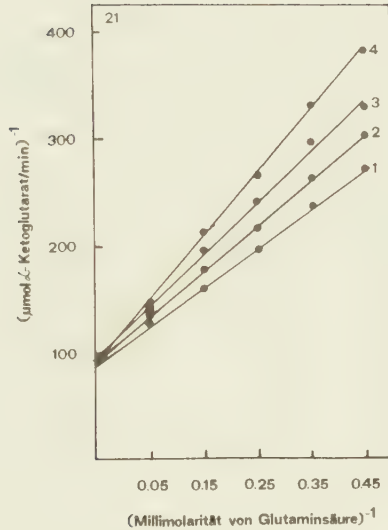


Abb. 21: Produktinhibition der Rückreaktion durch L-Alanin

Lineweaver-Burk Darstellung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von variierten L-Glutaminsäurekonzentrationen bei verschiedenen fixen Konzentrationen von L-Alanin. Die Pyruvatkonzentration wurde bei 0,333 mM konstant gehalten. Die Konzentrationen von L-Alanin betrugen: Gerade 1, 0 mM; Gerade 2, 1 mM; Gerade 3, 2 mM; Gerade 4, 3 mM.

Nach Reduktion der Gleichung 5b entsprechen die Steigungen (S) der in Abb. 22 dargestellten Geraden der Gleichung

$$S = \frac{K_{ALA} K_i^{KG}}{V_F (ALA) K_i^{GLU}} (GLU) + \left[K_{KG} + \frac{K_{KG} (ALA)}{K_{IA}} \right] (1/V_F) \quad (7a)$$

und die Ordinatenabschnitte (0) der Gleichung

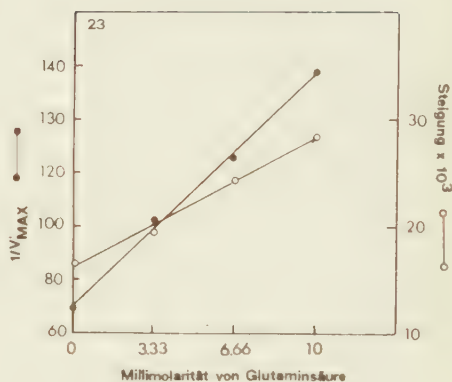
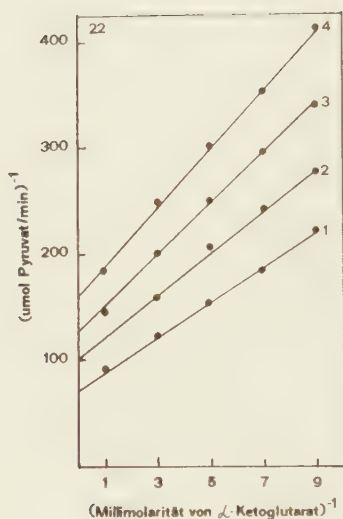


Abb. 22: Produktinhibition der Vorwärtsreaktion durch L-Glutaminsäure

Lineweaver-Burk Darstellung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von variierten Konzentrationen von α -Ketoglutarat bei verschiedenen fixen Konzentrationen von L-Glutaminsäure. Die L-Alaninkonzentration wurde bei 6,66 mM konstant gehalten. Die L-Glutaminsäurekonzentrationen betragen: Gerade 1, 0 mM; Gerade 2, 3,33 mM; Gerade 3, 6,66 mM; Gerade 4, 10 mM.

Abb. 23: Darstellung der Steigung und der reziproken relativen maximalen Anfangsreaktionsgeschwindigkeit aus Abb. 22 in Abhängigkeit von der Glutaminsäurekonzentration

$$0 = \frac{K_{ALA}}{V_F(ALA)K_i^{GLU}} (GLU) + \left[1 + \frac{K_{ALA}}{(ALA)} \right] (1/V_F) \quad (7b)$$

Werden die Steigungen der Geraden in Abb. 22 gegen die L-Glutaminsäurekonzentration aufgetragen, ergibt sich eine Gerade mit der Steigung S_{GLU} .

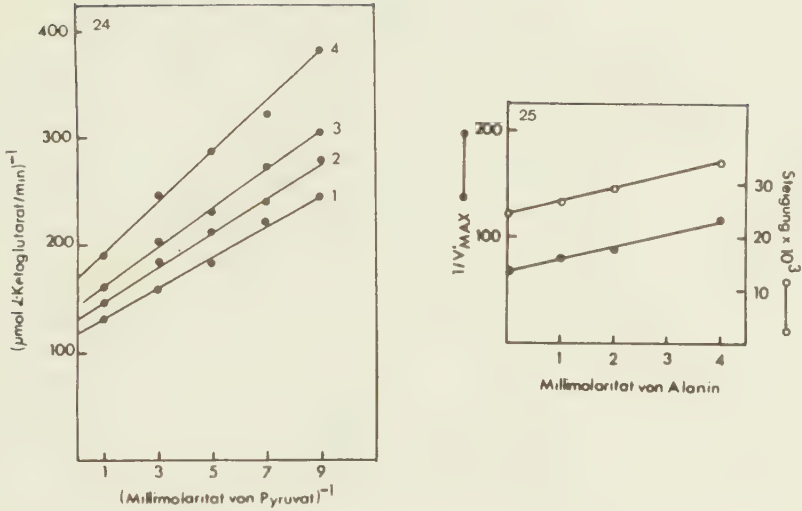


Abb. 24: Produktinhibition der Rückreaktion durch L-Alanin

Lineweaver-Burk Darstellung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von variierten Konzentrationen von Pyruvat bei verschiedenen fixen L-Alaninkonzentrationen. Die L-Glutaminsäurekonzentration wurde bei 10 mM konstant gehalten. Die L-Alaninkonzentrationen betrugen: Gerade 1, 0 mM; Gerade 2, 1 mM; Gerade 3, 2 mM; Gerade 4, 4 mM.

Abb. 25: Darstellung der Steigungen und der reziproken relativen maximalen Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten aus Abb. 24 in Abhängigkeit von der L-Alaninkonzentration

$$S_{\text{GLU}} = \frac{K_{\text{ALA}} K_i^{\text{kg}}}{V_{\text{F}}(\text{ALA}) K_i^{\text{glu}}} \quad (8a)$$

Die Abbildung der Ordinatenabschnitte gegen die Glutaminsäurekonzentrationen (Abb. 25) ergibt ebenfalls eine Gerade mit der Steigung O_{GLU} .

$$O_{\text{GLU}} = \frac{K_{\text{ALA}}}{V_{\text{F}}(\text{ALA}) K_i^{\text{glu}}} \quad (8b)$$

Tab. 2: Kinetik der L-Alanin-Aminotransferase

Zusammenstellung der experimentell gefundenen Werte.

Konstante	exp. Wert
V_F	0,026 $\mu\text{mol/min}$
V_R	0,020 $\mu\text{mol/min}$
K_{ALA}	$5,2 \times 10^{-3} \text{ M}$
K_{GLU}	$1,4 \times 10^{-2} \text{ M}$
K_{KG}	$4,3 \times 10^{-4} \text{ M}$
K_{PYR}	$2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$
K_i^{ala}	$6,0 \times 10^{-3} \text{ M}$
K_i^{glu}	$3,6 \times 10^{-3} \text{ M}$
K_i^{kg}	$1,4 \times 10^{-4} \text{ M}$
K_i^{pyr}	$2,2 \times 10^{-4} \text{ M}$
K_{eq}	2,6

$S_{\text{GLU}}/O_{\text{GLU}}$ ergibt K_i^{kg} . K_i^{glu} kann dann aus 8a oder 8b berechnet werden.

Mittels analoger Ueberlegungen wurden auch K_i^{pyr} und K_i^{ala} aus den Resultaten berechnet, die in Abb. 24 und 25 dargestellt sind. Die Werte für die Inhibitionskonstanten sind in Tab. 2 aufgeführt.

3.4. Berechnung der Gleichgewichtskonstanten

Die Gleichgewichtskonstante wurde aus den kinetischen Daten nach folgender Formel berechnet (Jenkins et al., 1959):

$$K_{\text{eq}} = \left[\frac{V_F}{V_R} \right]^2 \left[\frac{K_{\text{PYR}} K_{\text{GLU}}}{K_{\text{ALA}} K_{\text{KG}}} \right]$$

Für K_{eq} wurde der Wert 2,6 errechnet.

3.5. Inhibition mittels Substratanaloga

Verschiedene Dicarboxylsäuren erwiesen sich als potente Inhibitoren von Aminotransferasen (Jenkins et al., 1959; Vevlick und Vavra, 1962; Hopper und Segal, 1962; Mane und Mehrotra, 1977). In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der L-Maleinsäure auf die Vorwärtsreaktion untersucht.

Abb. 26 zeigt, dass die L-Maleinsäure gegenüber Alanin unkompetitiv und gegenüber L-Ketoglutaratsäure kompetitiv hemmt, also nur mit der Pyridoxaminform des Enzyms kombiniert.

L-Aminobuttersäure kann L-Alanin in geringem Umfang als Substrat ersetzen (Bulos und Handler, 1965). Die Aktivität im Vergleich mit L-Alanin beträgt jedoch nur 2 %. Abb. 27 zeigt, dass L-Aminobuttersäure gegenüber Alanin kompetitiv, gegenüber L-Ketoglutaratsäure unkompetitiv hemmt.

Tab. 3 fasst die Ergebnisse zusammen und gibt die Werte der Inhibitionskonstanten an.

Tab. 3 Inhibition der L-Alanin-Aminotransferase durch Substratanaloga

Inhibitor	Variables Substrat		Dissoziationskonstante	
	Aminosäure	Ketosäure	Enzym-Pyridoxal-Inhibitor-Komplex K_{II}	Enzym-Pyridoxamin-Inhibitor-Komplex K_{IS}
Maleinsäure	U	K	—	$5,9 \times 10^{-2} \text{ M}$
L-Aminobuttersäure	K	U	$8 \times 10^{-3} \text{ M}$	—

K: kompetitiv, U: unkompetitiv

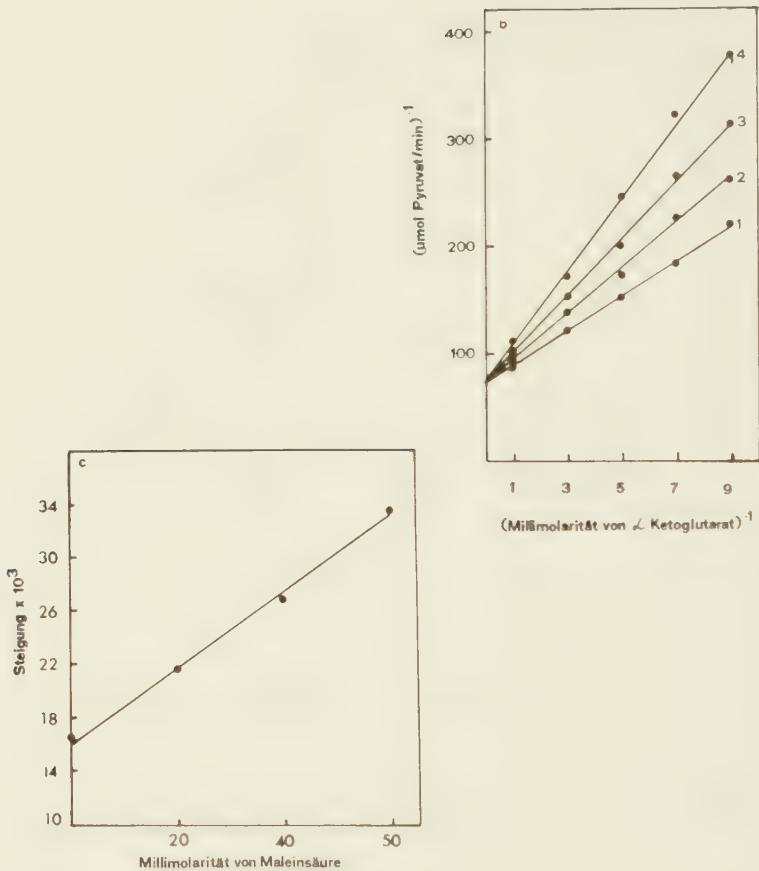


Abb.26: Inhibition durch Maleinsäure

a. Variables Substrat: L-Alanin

Die Konzentration der α -Ketoglutar säure wurde bei 0,333 mM konstant gehalten. Die Maleinsäurekonzentrationen betrugen: Gerade 1, 0 mM; Gerade 2, 20 mM; Gerade 3, 40 mM; Gerade 4, 60 mM.

b. Variables Substrat: α -Ketoglutar säure

Die L-Alaninkonzentration wurde bei 6,66 mM konstant gehalten. Die Maleinsäurekonzentrationen wurden gleich wie oben gewählt.

c. Darstellung der Steigungen der Geraden in Abb. b in Abhängigkeit von der Maleinsäurekonzentration.

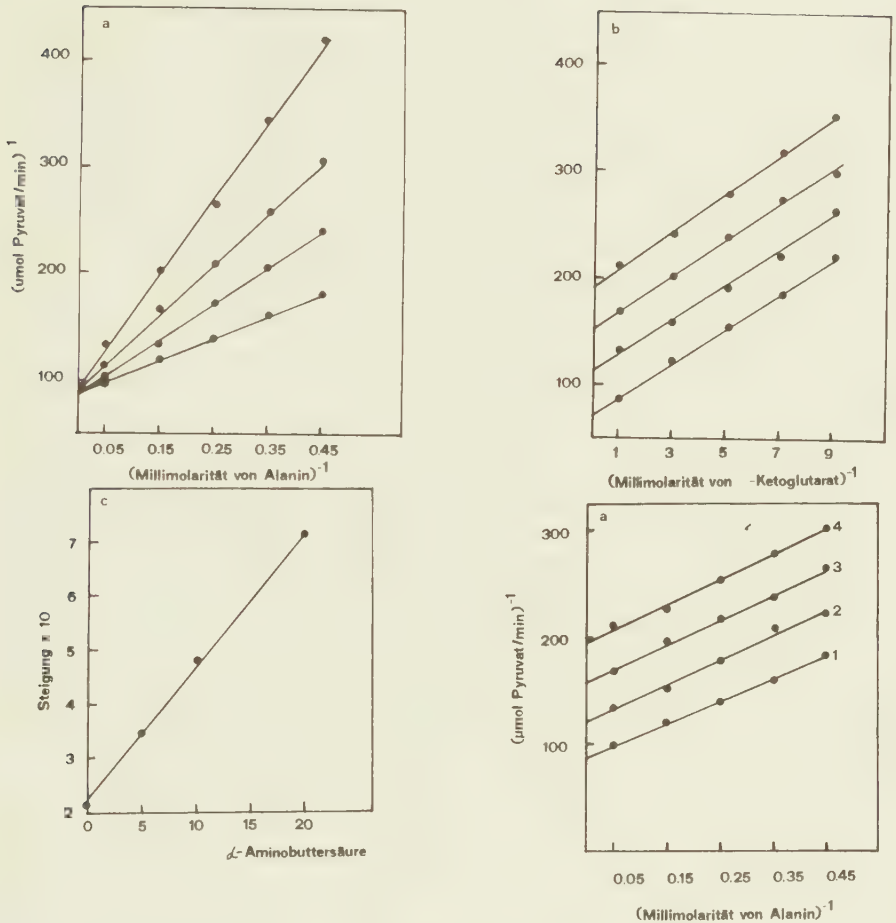


Abb.27: Inhibition durch α -Aminobuttersäure

a. Variables Substrat: L-Alanin

Die Konzentration der α -Ketoglutarsäure wurde bei 0,333 mM konstant gehalten. Die α -Aminobuttersäurekonzentrationen betrugen: Gerade 1, 0 mM; Gerade 2, 5 mM; Gerade 3, 10 mM; Gerade 4, 20 mM.

b. Variables Substrat: α -Ketoglutarsäure

Die L-Alaninkonzentration wurde bei 6,66 mM konstant gehalten. Die α -Aminobuttersäurekonzentrationen betrugen: Gerade 1, 0 mM; Gerade 2, 10 mM; Gerade 3, 20 mM; Gerade 4, 30 mM.

c. Darstellung der Steigungen der Geraden in Abb. a in Abhängigkeit von der α -Aminobuttersäurekonzentration.

3.6. Inhibition durch p-Chloromercuribenzoessäure

Transaminasen sind empfindlich auf die Behandlung mit Schwefelwasserstoff-Reagenzien wie p-Chloromercuribenzoessäure (pCMB). Wie Abb. 28 zeigt, hemmen schon geringe Konzentrationen von pCMB die AAT von *Drosophila*. Bei einer Konzentration von 5×10^{-6} M betrug die Restaktivität noch 4,4 % und bei 10^{-5} M konnte keine Aktivität mehr gemessen werden.

Durch pCMB inhibierte AAT lässt sich durch Inkubation mit Pyridoxalphosphat und 2-Mercaptoäthanol reaktivieren. Kane und Mehrotra (1976) erhielten eine Reaktivierung von 50 % der ursprünglichen Aktivität durch Inkubation mit 2-Mercaptoäthanol, wobei eine Zugabe von Pyridoxalphosphat ohne Wirkung blieb. Tab. 4 fasst die Resultate eines entsprechenden Experimentes zusammen. Durch Inkubation mit 10 μ mol 2-Mercaptoäthanol/ml konnte 50 % der ursprünglichen Aktivität wieder erhalten werden. Zusätzliche Beigabe von Pyridoxalphosphat führte jedoch nicht zu einer signifikanten Erhöhung des Reaktivierungsprozentsatzes. Vorinkubation mit 2-Mercaptoäthanol schützt das Enzym praktisch vollständig vor der Inaktivierung durch pCMB.

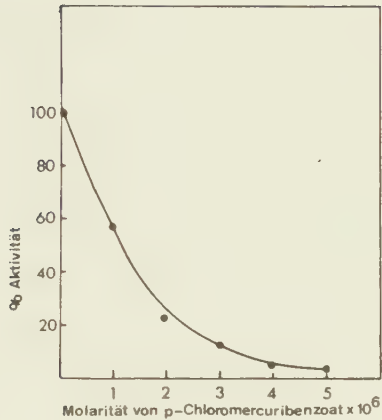


Abb. 28: Inhibition durch p-Chloromercuribenzoessäure

Das Reaktionsgemisch enthielt die unter "Material und Methoden" aufgeführten Komponenten, 0,02 U AAT und die angegebenen Konzentrationen von pCMB. Nach einer Vorinkubation von 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von L-Ketoglutarensäure gestartet.

Tab. 4: Reaktivierung der L-Alanin-Aminotransferase nach Inhibition durch p-Chloromercuribenzoessäure

Das Reaktionsgemisch enthielt die unter "Material und Methoden" aufgeführten Komponenten, 0,02 U AAT und die unten angegebenen Zusätze. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von L-Ketoglutarensäure. Die Vorinkubationszeiten betrugen 5 min.

Zusätzliche Komponenten		
1. Vorinkubation	2. Vorinkubation	% Aktivität
—	—	100
pCMB, 10 ⁻⁵ M	—	0
pCMB, 10 ⁻⁵ M	PLP, 0,3 M	0
pCMB, 10 ⁻⁵ M	2-Mercaptoaethanol, 0,01 M	49
pCMB, 10 ⁻⁵ M	PLP, 0,3 M + 2-Mercaptoaethanol, 0,01 M	49,8

3.7. Inhibition durch Aminosäuren, die nicht als Substrat dienen

Segal et al. (1962) fanden, dass eine Reihe von Aminosäuren, die von der AAT nicht als Substrat verwendet werden können, inhibitorische Wirkung zeigen. Ähnliche Resultate wurden in einem entsprechenden Experiment erhalten (Tab. 5). Mit L-Leucin und L-Valin wurden die stärksten Wirkungen erzielt.

Tab. 5: Inhibition durch Aminosäuren

Das Reaktionsgemisch enthielt die unter "Material und Methoden" aufgeführten Komponenten, C, C₂ U AAT und die angegebenen Aminosäuren in einer Konzentration von 0,05 M. Der pH der Aminosäurelösungen betrug 7,8. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von α -Ketoglutar säure.

Aminosäure	% Inhibition
L-Valin	15
L-Leucin	31,5
β -Alanin	9
D-Alanin	0
L-Glycin	9

4. Aktivität der L-Alanin-Aminotransferase während der Entwicklung von *Drosophila nigromelanica*

4.1. Aktivität in Ganztierhomogenaten

Die Aktivität der AAT pro Tier während der Puppenentwicklung zeigt ein U-förmiges Profil (Abb.29). Während der Larvalentwicklung nimmt sie stark zu und erreicht im Puppenstadium ein Minimum. Kurz vor dem Schlüpfen steigt sie wieder an. Während der adulten Entwicklung wurde ein leichter Anstieg bis zum 6. Tag gemessen. Der Anstieg ist besonders bei Weibchen ausgeprägt. Entwicklungsphysiologisch zeichnen sich die ersten 6 Tage der adulten Entwicklung durch die Reifung der Geschlechtsorgane aus, erfolgt doch die erste Kopulation und Eiablage frühestens zu diesem Zeitpunkt. Bei Männchen nimmt die Aktivität bis zum 12. Tage leicht und kontinuierlich zu.

4.2. Aktivität in Homogenaten von Kopf, Thorax und Abdomen

Die Aktivität der AAT pro Kopf nimmt während der adulten Entwicklung leicht zu, von $7,2 \times 10^{-3}$ U/Kopf auf $10,3 \times 10^{-3}$ bei Männchen bzw. auf $12,4 \times 10^{-3}$ bei Weibchen. Bei jungen Tieren wurde die höchste Aktivität im Thorax gemessen. Im Abdomen ist sie verhältnismässig gering und steigt während der Adultentwicklung um das Doppelte an (Tab. 6). Dagegen bleibt die Aktivität im Thorax in der gleichen Grössenordnung.

Die prozentuale Verteilung der Aktivität zeigt, dass bei frischgeschlüpfen Tieren der grösste Prozentsatz im Thorax zu finden ist. Im Laufe der Entwicklung ergibt sich ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Thorax und Abdomen. Der prozentuale Anteil der Aktivität im Kopf bleibt mit 10 - 12 % während der ganzen adulten Entwicklung konstant.

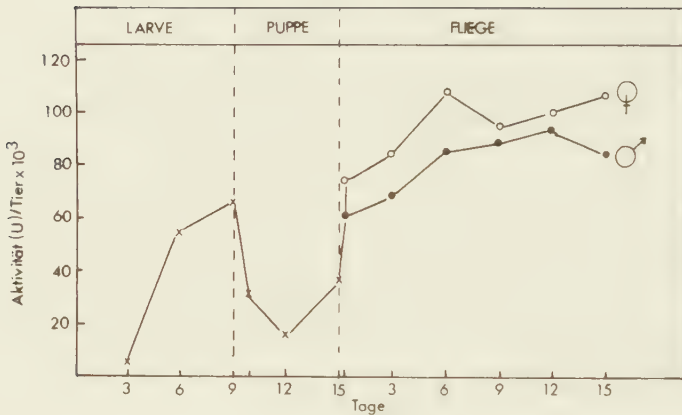


Abb.29: Verlauf der Alanin-Aminotransferaseaktivität in Ganz-
tierhomogenaten von Drosophila nigromelanica während
der Entwicklung

Angegeben sind die Mittelwerte aus 5 - 6 Bestimmungen.

4.3. Aktivität in Homogenaten der Geschlechtsorgane

Die zu sezierenden Tiere wurden Zuchtflaschen entnommen, die beide Geschlechter enthielten. Da ein Einfluss der Begattung auf die Enzymaktivität nicht auszuschliessen war, wurde in einem Vorversuch die Aktivität in Hoden von Männchen, die dauernd mit der 5-fachen Anzahl Weibchen zusammenlebten, und solchen, die seit dem Schlüpfen isoliert waren, verglichen. Bei 9- und 12-tägigen Tieren ergaben sich keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Tab. 6: Aktivität der L-Alanin-Aminotransferase in Homogenaten von Kopf, Thorax und Abdomen während der adulten Entwicklung von *Drosophila nigromelanica*

Angegeben sind die Mittelwerte aus 5 - 6 Bestimmungen, die Standardabweichungen und die prozentuale Verteilung der Aktivität auf die einzelnen Körperabschnitte.

Geschlecht	Alter	Aktivität/ Kopf $U \times 10^3$	%	Aktivität/ Thorax ₃ $U \times 10^3$	%	Aktivität/ Abdomen ₃ $U \times 10^3$	%
Männchen	0	$7,2 \pm 0,6$	11,2	$33,3 \pm 6,7$	54,2	$21,0 \pm 1,2$	34,1
	3	$7,5 \pm 0,9$	11,0	$38,7 \pm 3,1$	56,9	$21,8 \pm 3,3$	32,1
	6	$9,7 \pm 0,7$	11,3	$40,5 \pm 3,4$	47,0	$35,9 \pm 2,6$	41,7
	9	$10,3 \pm 0,4$	11,6	$37,5 \pm 2,4$	42,1	$41,2 \pm 1,6$	46,3
	12	$10,3 \pm 0,6$	10,9	$38,8 \pm 4,4$	40,8	$45,8 \pm 2,3$	48,3
	15	$10,3 \pm 0,9$	12,3	$36,3 \pm 4,3$	43,6	$36,7 \pm 3,7$	44,1
Weibchen	0	$7,1 \pm 0,9$	11,9	$37,3 \pm 2,5$	62,3	$15,5 \pm 2,2$	25,8
	3	$9,5 \pm 0,9$	11,3	$39,5 \pm 4,7$	47,1	$34,8 \pm 1,6$	41,6
	6	$10,5 \pm 1,1$	10,5	$44,3 \pm 3,0$	44,3	$45,1 \pm 2,7$	45,2
	9	$11,2 \pm 1,2$	12,1	$37,4 \pm 9,7$	40,4	$44,1 \pm 3,8$	47,5
	12	$12,3 \pm 0,7$	12,2	$40,8 \pm 2,7$	40,6	$47,5 \pm 2,9$	47,2
	15	$12,4 \pm 1,2$	11,5	$49,6 \pm 7,2$	45,9	$46,1 \pm 2,1$	42,6

In den Hoden ist bis zum 15. Tage eine mehr als 10-fache Zunahme der AAT-Aktivität festzustellen, wobei die grösste Zunahme zwischen dem 3. und dem 6. Tag erfolgt. Die spezifische Aktivität nimmt in der gleichen Zeit nur um das 4-fache zu (Tab.7).

Tab. 7: Aktivität der L-Alanin-Aminotransferase in den Hoden von *Drosophila nigromelanica*

Angegeben sind die Mittelwerte aus 5 - 6 Bestimmungen und die Standardabweichung.

Alter Tage	Aktivität/ Hodenpaar $U \times 10^3$	Proteingehalt/ Hodenpaar μg	Spezifische Aktivität $U/mg \text{ Protein}$
0	$0,7 \pm 0,06$	$3,5 \pm 0,5$	0,20
3	$1,9 \pm 0,3$	$6,3 \pm 1,5$	0,30
6	$5,0 \pm 0,4$	$13,2 \pm 1,2$	0,38
9	$8,9 \pm 0,5$	$13,0 \pm 0,5$	0,68
12	$9,8 \pm 0,6$	$13,2 \pm 1,5$	0,74
15	$10,5 \pm 0,8$	$12,5 \pm 1,5$	0,84

Vorversuche ergaben, dass unterschiedliche Enzymaktivitäten in den Ovarien begatteter und unbegatteter Weibchen erwartet werden mussten (vergl. Abschnitt 4.6.). Aus 3 gemischtgeschlechtlichen Populationen wurden deshalb je 10 Weibchen entnommen und in Einzelzuchten gehalten. Alle Tiere legten befruchtete Eier. Die Wahrscheinlichkeit, für die Sektion solcher Tiere der Zuchtflasche ein unbefruchtetes Weibchen zu entnehmen, ist somit sehr gering. Die folgenden Resultate gelten also ab dem 9. Tag für befruchtete Weibchen. 6-tägige Tiere waren erst zum Teil begattet. In der Enzymaktivität und im Proteingehalt unterschieden sich die Ovarien von isoliert und gemischtgeschlecht-

lich gehaltenen Tieren in diesem Stadium noch nicht. Die Ovarien von frischgeschlüpften Tieren wurden nicht seziiert, da sie noch sehr klein waren und kaum ohne Beschädigung aus den reichlich vorhandenen Tracheen gelöst werden konnten.

Die sichtbare Vitellogenineinlagerung in die Oocyten beginnt am 3. Tage nach dem Schlüpfen, die ersten Eier werden am 6. Tag gelegt. Der Vorgang der Eireifung vom 3. bis zum 6. Tag drückt sich in der starken Zunahme des Proteingehaltes von 5,3 μg auf 26,6 μg pro Ovarpaar aus (Tab. 8). Gleichzeitig nimmt auch die Enzymaktivität stark zu. Die Zunahme der Aktivität hält bis zum 12. Tage an, während der Proteingehalt nach dem 9. Tag abnimmt. Die spezifische Aktivität nimmt vom 6. bis zum 15. Tag um mehr als das Doppelte zu.

Tab. 8: Aktivität der L-Alanin-Aminotransferase in den Ovarien von *Drosophila nigromelanica*

Angegeben sind die Durchschnittswerte aus 5 - 6 Bestimmungen und die Standardabweichung.

Alter Tage	Aktivität/ Ovarienpaar $\text{U} \times 10^3$	Proteingehalt/ Ovarienpaar μg	Spezifische Aktivität $\text{U}/\text{mg Protein}$
3	$1,7 \pm 0,3$	$5,3 \pm 0,4$	0,32
6	$4,7 \pm 0,9$	$26,6 \pm 3,5$	0,18
9	$6,2 \pm 0,7$	$36,6 \pm 2,9$	0,17
12	$9,6 \pm 0,7$	$30,5 \pm 2,9$	0,31
15	$8,9 \pm 0,3$	$21,2 \pm 2,4$	0,42

4.4. Aktivität in Fettkörperhomogenaten

Die Fettkörper von 6- und 9-tägigen Larven unterscheiden sich nicht signifikant in der AAT-Aktivität. Der Proteingehalt des Fettkörpers verpuppungsreifer Larven (9 Tage alt) liegt jedoch 4 x höher als bei 6-tägigen Tieren, da zu diesem Zeitpunkt Hämolympheproteine aufgenommen und gespeichert werden (Wyatt, 1974). Die spezifische Aktivität fällt demzufolge von 0,89 auf 0,22 (Tab. 9).

Bei den Adulttieren wurde wie unter 4.3. untersucht, ob die Begattung einen Einfluss auf die AAT-Aktivität und den Proteingehalt des Fettkörpers hat. Bei Männchen konnte kein Einfluss festgestellt werden, während sich bei den Weibchen die Fettkörper begatteter und unbegatteter Tiere in AAT-Aktivität und Proteingehalt unterschieden (siehe Abschnitt 4.6.). Die folgenden Resultate gelten für befruchtete Weibchen.

Die AAT-Aktivität im männlichen und weiblichen Fettkörper bleibt während der Adultentwicklung in der gleichen Grössenordnung (Tab. 9). Bei Weibchen wurde die höchste Aktivität am 3. Tag gemessen, zu Beginn der sichtbaren Vitellogenineinlagerung in die Oocyten. Die spezifische Aktivität ist bei frischgeschlüpften Tieren am höchsten und sinkt im Verlaufe der weiteren Entwicklung.

Tab. 9: Aktivität der L-Alanin-Aminotransferase im Fettkörper von *Drosophila nigromelanica*

Angegeben sind die Durchschnittswerte aus 5 - 10 Bestimmungen und die Standardabweichung.

Alter Tage	Aktivität/ Fettkörper $U \times 10^3$	Proteingehalt/ Fettkörper μg	Spezifische Aktivität $U/mg \text{ Protein}$	
6	$13,6 \pm 0,9$	$15,2 \pm 2,7$	0,89	Larven
9	$14,0 \pm 1,0$	$63,5 \pm 8,5$	0,22	
0	$10,7 \pm 0,8$	$6,2 \pm 0,9$	1,73	Männchen
3	$11,6 \pm 1,1$	$7,9 \pm 0,7$	1,47	
6	$13,9 \pm 1,2$	$13,2 \pm 1,8$	1,05	
9	$14,4 \pm 1,2$	$17,0 \pm 2,7$	0,85	
12	$14,6 \pm 0,7$	$16,5 \pm 1,2$	0,88	
15	$13,2 \pm 1,6$	$9,6 \pm 1,6$	1,38	
0	$12,3 \pm 0,7$	$5,2 \pm 0,5$	2,37	Weibchen
3	$16,4 \pm 2,0$	$12,6 \pm 1,4$	1,30	
6	$14,6 \pm 2,1$	$9,2 \pm 1,5$	1,59	
9	$13,7 \pm 1,7$	$12,4 \pm 2,8$	1,10	
12	$13,0 \pm 1,7$	$12,5 \pm 1,8$	1,04	
15	$11,4 \pm 1,7$	$9,2 \pm 2,7$	1,24	

4.5. Aktivität in Homogenaten des Mitteldarms

Die höchste AAT-Aktivität im Mitteldarm wurde bei 6-tägigen Larven gefunden ($23,2 U \times 10^{-3}/\text{Mitteldarm}$). Bei verpuppungsreifen Larven betrug sie nur noch die Hälfte dieses Wertes (Tab.10). Ein starker Abfall vom 6. bis zum 9. Tag ist auch bei der spezifischen Aktivität festzustellen.

Bei den Adulttieren wurde nur der Mitteldarm von Weibchen untersucht, da in diesem Fall keine wesentlichen Geschlechtsunterschiede zu erwarten sind. Nach einer Verdoppelung vom Schlüpfen bis zum 3. Tag bleibt die Aktivität während der

weiteren Entwicklung konstant. Die spezifische Aktivität steigt in der gleichen Zeitspanne von 0,43 auf 1,02 und bleibt in den weiteren Stadien um 0,7 konstant.

Tab.10: Aktivität der L-Alanin-Aminotransferase im Mitteldarm von *Drosophila nigromelanica*

Angegeben sind die Durchschnittswerte von 5 - 6 Bestimmungen und die Standardabweichung.

Alter Tage	Aktivität/ Mitteldarm $U \times 10^3$	Proteingehalt/ Mitteldarm μg	Spezifische Aktivität $U/mg \text{ Protein}$	
6	$23,2 \pm 1,2$	$24,3 \pm 3,8$	0,46	Larven
9	$11,1 \pm 1,1$	$24,3 \pm 1,3$	0,46	
0	$2,6 \pm 0,4$	$6,1 \pm 0,9$	0,43	Fliegen
3	$5,8 \pm 0,9$	$5,7 \pm 0,5$	1,02	
6	$5,7 \pm 0,7$	$7,4 \pm 0,9$	0,77	
9	$5,7 \pm 0,3$	$7,8 \pm 0,9$	0,73	
12	$5,6 \pm 0,4$	$7,7 \pm 1,0$	0,73	
15	$7,3 \pm 0,5$	$10,2 \pm 1,1$	0,72	

4.6. Unterschiede der L-Alanin-Aminotransferasenaktivität in den Ovarien und im Fettkörper zwischen begatteten und virginellen Weibchen

Baumann (1974) untersuchte den Einfluss der Begattung auf die Proteinsynthese in den Ovarien von *Drosophila funebris*. Er fand nach der Begattung eine Stimulation der Proteinsynthese in den Ovarien. Der Einfluss auf den Fettkörper blieb unklar. Da verschiedene Autoren (Belzecka et al., 1959; McAllen and Chefurka, 1961; Chen, 1966; Gilbert, 1967) eine Beziehung zwischen der Proteinsynthese und der Transaminasenaktivität vermuten, erschien es sinnvoll, den Einfluss der Begattung auf die AAT-Aktivität zu untersuchen.

Die Ovarien unbegatteter, 9 - 15 Tage alter Weibchen zeichnen sich gegenüber begatteten durch einen doppelt so hohen Proteingehalt und eine doppelte AAT-Aktivität aus (Tab.11). Der erhöhte Proteingehalt kommt durch das Zurückhalten der reifen Eier zustande. Nach 12 Tagen beginnen auch die virginellen Weibchen mehr Eier zu legen, was sich auf Proteingehalt und Enzymaktivität auswirkt. Dies lässt den Schluss zu, dass zumindest ein Teil der AAT-Aktivität in den Eiern lokalisiert ist.

Im Fettkörper virgineller Weibchen wurde ebenfalls ein erhöhter Proteingehalt festgestellt (Tab.12). Gegenüber begatteten Weibchen beträgt die AAT-Aktivität etwa das Doppelte. Die Interpretation dieses Befundes ist nicht einfach und soll im Kapitel "Diskussion" versucht werden.

Tab. 11: Vergleich der Aktivität der L-Alanin-Aminotransferase in den Ovarien von begatteten und virginellen Weibchen von *Drosophila nigromelanic*

Angabegeben sind die Durchschnittswerte aus 5 - 6 Bestimmungen und die Standardabweichung.

Alter	begattete Weibchen			virginelle Weibchen		
	Aktivität/ Ovarienpaar	Proteingehalt/ Ovarienpaar	Spezifische Aktivität	Aktivität/ Ovarienpaar	Proteingehalt/ Ovarienpaar	Spezifische Aktivität
Tage	μg	μg	U/mg Protein	μg	μg	U/mg Protein
9	$6,2 \pm 0,7$	$36,6 \pm 2,9$	0,17	$13,8 \pm 1,1$	$74,6 \pm 5,2$	0,18
12	$9,6 \pm 0,7$	$30,5 \pm 2,9$	0,31	$16,8 \pm 0,9$	$73,0 \pm 6,2$	0,23
15	$8,9 \pm 0,3$	$21,2 \pm 2,4$	0,42	$15,7 \pm 1,5$	$44,3 \pm 4,8$	0,35

Tab. 12: Vergleich der Aktivität der L-Alanin-Aminotransferase im Fettkörper von begatteten und virginellen Weibchen von *Drosophila nigromelanic*

Angabegeben sind die Durchschnittswerte aus 10 Bestimmungen und die Standardabweichung.

Alter	begattete Weibchen			virginelle Weibchen		
	Aktivität/ Fettkörper	Proteingehalt/ Fettkörper	Spezifische Aktivität	Aktivität/ Fettkörper	Proteingehalt/ Fettkörper	Spezifische Aktivität
Tage	μg	μg	U/mg Protein	μg	μg	U/mg Protein
12	$13,0 \pm 1,7$	$12,4 \pm 1,8$	1,04	$22,2 \pm 1,6$	$14,5 \pm 1,6$	1,53
15	$11,4 \pm 1,7$	$9,2 \pm 2,7$	1,24	$23,5 \pm 3,1$	$18,4 \pm 3,4$	1,28

IV. Diskussion

1. Reinigung der L-Alanin-Aminotransferase

Matsuzawa und Segal (1968) und Saier und Jenkins (1966) isolierten aus Rattenleber und Schweineherz AAT von hohem Reinheitsgrad. Die spezifischen Aktivitäten dieser Präparationen lassen sich nicht direkt mit der unsrigen vergleichen, da die Autoren zur Aktivitätsbestimmung Assays mit anderen Substratkonzentrationen verwendeten und die Enzyme vor allem für L-Alanin eine höhere Michaelis-Konstante aufwiesen. Immerhin liegen sie in der gleichen Grössenordnung, wobei in unserem Falle die Proteinbestimmung etwas zu hoch ausgefallen sein könnte, da das Enzym vor der Bestimmung mit TCA präzipitiert wurde, was möglicherweise Verluste zur Folge hatte.

Die von den anderen Autoren angewandten Reinigungsmethoden konnten nicht übernommen werden. Die Erhitzung des Rohhomogenates und die Reinigung mittels Calciumphosphat-Gel im Batch-Verfahren führten zu hohen Aktivitätsverlusten. Schwierigkeiten bereitete vor allem der grosse Lipidgehalt im Rohhomogenat, der aber durch die ersten Reinigungsschritte stark reduziert werden konnte. Die Verwendung einer Sephadex G-50-Säule erwies sich als besonders vorteilhaft. Da darauf verzichtet wurde, nach der Ammoniumsulfat-Fällung eine vollständige Lösung der Lipide zu erreichen, blieb ein grosser Teil auf der Säule, löste sich erst allmählich und konnte so ohne bemerkenswerte Aktivitätsverluste vom enzymhaltigen Teil abgetrennt werden. Zugleich blieben auch die Pigmente in der Säule zurück. Nach der ersten Chromatographie über DEAE-Cellulose war der Extrakt lipid- und pigmentfrei.

Die weiteren Isolationsschritte mussten möglichst schnell durchgeführt werden, da die starke Verdünnung der Enzymlösung,

welche bei jedem Schritt in Kauf genommen wurde, zu hohen Aktivitätsverlusten führte.

Andere Reinigungsmethoden, wie präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese oder isoelektrische Fokussierung, erwiesen sich wegen der Labilität des Enzyms als ungeeignet.

2. Charakterisierung der L-Alanin-Aminotransferase

Die Insekten-AAT kommt im Cytosol und an die Mitochondrien gebunden vor (Kilby und Neville, 1957; Pette und Luh, 1962). Mane und Mehrotra (1976) fanden, dass sowohl das mitochondriale als auch das cytosolische Enzym von *Schistocerca* aus Untereinheiten besteht. Ersteres kommt hauptsächlich in der dimeren Form, letzteres in der monomeren und dimeren Form vor, während für beide in geringen Mengen auch Tetramere gefunden wurden. Die verschiedenen Formen konnten mittels Chromatographie über DEAE-Cellulose und Sephadex G-200 voneinander getrennt werden. Wie schon Chen und Baker (1976) fanden wir bei *Trosophila* keine ähnlichen Verhältnisse in bezug auf das chromatographische Verhalten der AAT.

Auch bei Säugern ist ein Teil der AAT in den Mitochondrien gefunden worden. Swick et al. (1965) zeigten, dass sich das mitochondriale und cytosolische Enzym in der Stabilität, der Ansprechbarkeit auf Hydrocortison und in der Michaelis-Konstanten L-Alanin unterscheiden. Katunuma et al. (1962) gelang mittels Chromatographie über Calciumphosphat eine Trennung der beiden Enzyme. Auf Grund dieser Befunde wird angenommen, dass die Säuger-AAT als zwei Isozyme vorkommt. Wegen der ausgesprochenen Labilität des mitochondrialen Isozyms erfolgte bisher keine intensive Charakterisierung.

Die bisher aus Säugern isolierte, cytosolische AAT besteht nicht aus Untereinheiten (Gatehouse et al., 1967). Reine AAT

wurde durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese in zwei Banden aufgetrennt, zeigte jedoch in der Sedimentationsanalyse ein einheitliches Verhalten. Die Autoren vermuten, dass es sich um sehr ähnliche Subformen des Enzyms handelt. Saier und Jenkins (1967) erhielten ebenfalls keine Hinweise auf Untereinheiten.

Die von uns isolierte AAT dürfte ebenfalls cytosolischer Herkunft sein, da nach der schonenden Homogenisation durch Zentrifugation die Mitochondrien entfernt wurden. Das chromatographische Verhalten und die Ergebnisse der Polyacrylamid-Gelelektrophorese deuten auf eine einzige native Form der cytosolischen AAT von *Drosophila* hin.

Für das Molekulargewicht der AAT aus Schweineherz wurde mittels Ultrazentrifugation ein Wert von 115'000, mittels Gelfiltration einer von 90'000 ermittelt (Saier und Jenkins, 1967), was gut mit dem durch Ultrazentrifugation erhaltenen Wert von 114'000 für die AAT aus Rattenleber übereinstimmt (Gatehouse et al., 1967). Mane und Mehrotra fanden ein Molekulargewicht von 63'000 für das Monomer des Enzyms aus *Schistocerca*.

Mittels Gelfiltration erhielten wir für die AAT aus *Drosophila nigromelanica* ein Molekulargewicht von 113'000, ein Wert, der gut mit den bei Säugern gefundenen Werten übereinstimmt und in dieser Größenordnung auch von Chen und Baker (1976) mit einem nur wenig gereinigten Präparat von *Drosophila* erhalten wurde. Die SDS-Gelelektrophorese ergab ein Molekulargewicht von 56'000. Es kann daraus geschlossen werden, dass das native Enzym aus zwei Untereinheiten besteht, die im Molekulargewicht gut mit dem Monomer der AAT aus *Schistocerca* übereinstimmen.

Die Verwendung der Gesamtreaktionsgeschwindigkeitsgleichung von Bulos und Handler (1965) führte zu den theoretisch erwarteten Ergebnissen bei den kinetischen Untersuchungen. Demnach erfolgt die Transaminierung durch die AAT aus *Drosophila* nach dem Ping-Pong Mechanismus, was für Aminotransferasen allgemein bekannt ist (Mahler und Cordes, 1971).

Tab. 13: Vergleich der Michaelis-Konstanten von L-Alanin-Aminotransferasen verschiedener Herkunft

Herkunft der AAT	K _{ALA} mM	K _{GLU} mM	K _{KG} mM	K _{PYR} mM	Referenz
Drosophila	5,2	14	0,43	0,25	diese Arbeit
Rattenleber	34	15	1,1	0,9	Hopper und Segal (1962)
Schweineherz	28	18	0,4	0,3	Saier und Jenkins (1966)
Rinderherz	10	8,1	0,12	0,23	Bulos und Handler (1965)
Schistocerca (Mitochondrien)	19	-	1,6	-	Mane und Mehrotra (1976)
Sarcophaga (Mitochondrien)	27	-	3,33	-	Donnellan et al. (1974)

Die Michaelis-Konstanten für Glutaminsäure, Pyruvat und *L*-Ketoglutarsäure stimmen gut mit den von anderen Autoren berichteten überein (Tab. 13). Wie von Chen und Baker (1976) wurde ein deutlich tieferer Wert für L-Alanin gefunden. Erstmals bestimmten wir für das Insektenenzym die Michaeliskonstanten der Rückreaktion. Die erhaltenen Werte stimmen gut mit denjenigen von Säugern überein.

In Bezug auf die Produkthemmung durch die Aminosäuren wurde das theoretisch erwartete Ergebnis erhalten. Die Inhibitions-konstanten unterscheiden sich nicht wesentlich von den von Bulos und Handler (1965) erhaltenen.

Die Experimente mit den beiden Substratanaloga Maleinsäure und *L*-Aminobuttersäure ergaben kompetitive bzw. unkompetitive Inhibition gegenüber *L*-Ketoglutarsäure und unkompetitive bzw.

kompetitive gegenüber L-Alanin. Vevlick und Vavra (1962) und Hopper und Segal (1962) berichteten, dass Maleinsäure gegenüber beiden Substraten kompetitiv hemmt. Unsere Resultate entsprechen jedoch denjenigen von Bulos und Handler (1965).

L-Aminobuttersäure hemmt nach Bulos und Handler (1965) gegenüber beiden Substraten nichtkompetitiv. Dies wird damit erklärt, dass, ähnlich wie bei hohen Substratkonzentrationen, abortive Komplexe mit der Pyridoxaminform des Enzyms gebildet werden. Bei unseren Experimenten war die Inhibitorkonzentration möglicherweise zu gering, und die abortiven Komplexe traten quantitativ nicht in Erscheinung. Saier und Jenkins (1966) erhielten mit L-Aminobuttersäure ebenfalls kompetitive Inhibition gegenüber L-Alanin.

Die Inhibitionsexperimente mittels pCMB erbrachten mit anderen Autoren (Braunstein, 1960; Fasella et al., 1970; Segal et al., 1962) übereinstimmende Ergebnisse. Die starke Hemmung durch geringe pCMB-Konzentrationen und die Reaktivierung durch 2-Mercaptoethanol zeigen, dass auch bei der Drosophila-AAT -SH-Gruppen für die Funktionsfähigkeit notwendig sind.

3. Aktivität der L-Alanin-Aminotransferase während der Entwicklung von Drosophila nigromelanica

Die AAT-Aktivität während der Puppenentwicklung zeigt einen U-förmigen Verlauf (Abb.29). Dies steht in Übereinstimmung mit den Resultaten von McAllen und Chefurka (1961), welche den Aktivitätsverlauf der Aspartat-Aminotransferase während der Entwicklung von Musca untersuchten. Die Aktivitätsabnahme während des Puppenstadiums widerspiegelt die allgemein festgestellte, geringe metabolische Aktivität während dieses Stadiums (Chen, 1971).

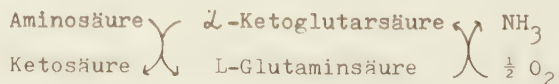
Zwischen 40 und 60 % der AAT-Aktivität sind im Thorax lokalisiert. Da der grösste Teil des Thorax aus Muskelgewebe besteht, muss die Bedeutung der AAT im Stoffwechsel der Muskulatur diskutiert werden.

Bei Weibchen und bei Männchen wurde die höchste Aktivität im Thorax junger Tiere gefunden, wo die Bildung der Muskulatur noch im Gange ist. Verschiedene Autoren haben einen Zusammenhang zwischen der Transaminasenaktivität und der Proteinsynthese postuliert (Belzecka et al., 1959; Mc Allen und Chefurka, 1961; Chen, 1966; Gilbert, 1967). Den Transaminasen kommt die Aufgabe zu, den Aminosäurepool für die Proteinsynthese aufrecht zu erhalten (Meister, 1965).

Eine weitere Bedeutung hat die AAT im Energiemetabolismus der Muskulatur. Bei verschiedenen Insektenarten wird Prolin sowohl durch isolierte Mitochondrien als auch in vivo zu L-Glutaminsäure oxydiert (Sacktor, 1974; Crabtree und Newsholme, 1970; Bursell, 1963). Durch Transaminierung von Pyruvat entsteht L-Alanin und L-Ketoglutarinsäure, wobei letztere im Krebszyklus weiter metabolisiert wird (Sacktor und Childress, 1967; Bursell, 1975). Inwieweit die von uns festgestellte hohe AAT-Aktivität im Thorax mit diesem Reaktionsweg in Zusammenhang steht, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Ueber die Bedeutung der Aminotransferasen im Fettkörper ist wenig bekannt. Die während der Entwicklung praktisch gleich bleibende AAT-Aktivität im larvalen und adulten Fettkörper deutet auf eine grundlegende Funktion hin. Einige Möglichkeiten sollen hier diskutiert werden.

Kilby und Neville (1957) fanden im Schistocerca-Fettkörper eine hohe Glutamatdehydrogenasen-Aktivität. Sie postulieren oxydative Deaminierung der L-Glutaminsäure zur Energiegewinnung. In Kombination mit verschiedenen Aminotransferasen wäre dies ein allgemeiner Mechanismus zur Oxydation von Aminosäuren.



Umgekehrt könnte dieser Mechanismus auch zur Detoxifikation dienen bei hohem Ammoniakgehalt.

Zur Detoxifikation kann die AAT auch durch Bereitstellung von Glutaminsäure zur Glutaminsynthese beitragen.

Besser untersucht ist die Funktion der AAT in der Prolinsynthese, welche im Fettkörper stattfindet. Bursell (1977) fand, dass das von der Flugmuskulatur bei der Prolinoxydation gebildete L-Alanin an die Hämolymphe abgegeben und nach dem Transport in den Fettkörper zu Prolinsynthese wieder verwendet wird. Dabei ist im initialen Schritt die AAT beteiligt, welche α -Ketoglutaratsäure zu Glutaminsäure transaminiert.

Proteinnahrung, Hungern oder Diabetes induzieren in der Leber von Säugern eine hohe AAT-Aktivität. L-Alanin, welches unter Hungerbedingungen von der Skelettmuskulatur und weiteren Geweben freigesetzt wird, dient als Carrier für die Gluconeogenese (Snell, 1979). Aus L-Alanin wird das für die Gluconeogenese notwendige Pyruvat gebildet (Katunuma et al., 1968). Ueber die Bedeutung der Gluconeogenese bei Insekten ist wenig bekannt. Wie in gluconeogenen Geweben von Säugern (De Rosa und Swick, 1975) wurde auch bei *Periplaneta* das gleichzeitige Vorhandensein der AAT und der Phosphoenolpyruvat-Kinase festgestellt (Storey und Bailey, 1977). Wigglesworth (1942) zeigte, dass *Aedes* fähig ist, nach Hungern Glycogen aus Alanin zu bilden. Geer und Zaccharias (1973) fanden eine erhöhte AAT-Aktivität, wenn sie kohlehydratarmer Nahrung L-Asparaginsäure und L-Alanin beifügten. Ob dies die Folge einer Induktion der Gluconeogenese ist oder die erhöhte AAT-Aktivität lediglich einer schnelleren Degradation der Aminosäuren zur Energiegewinnung dient, kann aus diesen Resultaten nicht geschlossen werden. Bei Säugern erfolgt nach Induktion der Gluconeogenese nur eine Erhöhung der cytoplasmatischen AAT-Aktivität (Katunuma et al., 1968). Die Autoren folgerten, dass die cytoplasmatische AAT hauptsächlich mit der Gluconeogenese, die mitochondriale mit dem Energiestoffwechsel gekoppelt ist.

Durch ähnliche Versuche wie bei Säugern könnte geklärt werden, ob die AAT im Fettkörper für die Gluconeogenese eine Bedeutung hat.

Drosophila-Spermien sind in hohem Masse fähig, Kohlehydrate und Aminosäuren zu metabolisieren (Geer et al., 1972). Die von Geer et al. (1973) durchgeführten Versuche ergaben, dass L-Alanin im Hoden von *Drosophila hydei* sehr schnell decarboxyliert wird. Die gleichzeitig sehr hohe AAT-Aktivität spricht dafür, dass das Enzym mit dem energieliefernden Metabolismus der *Drosophila*-Spermien in Zusammenhang steht. Wir fanden einen starken AAT-Aktivitätsanstieg bis zum 6. Tag in den Hoden von *Drosophila nigromelanica*. Dies ist der Zeitpunkt der ersten Kopulation. Der Anstieg scheint mit der Spermiogenese korreliert zu sein, denn in der gleichen Zeit nimmt der Proteingehalt der Hoden ebenfalls zu. Weitere Untersuchungen müssen die Bedeutung der AAT im Hoden von *Drosophila* klären. Von Interesse ist in diesem Zusammenhang, dass in den Paragoniendrüsen von *Drosophila nigromelanica* Glutaminsäure akkumuliert, wenn die Männchen keine Gelegenheit zur Kopulation haben (Chen und Lechslin, 1976). Das Paragoniensekret wird bei der Kopulation in die Weibchen übertragen. Die Glutaminsäure aus den Paragonien könnte als Energiereserve für die Spermien dienen.

In den Ovarien wurde ein Anstieg der AAT-Aktivität vom 3. bis zum 6. Tag gemessen, der begleitet ist von einer Proteinzunahme von 5,3 µg auf 26,6 µg/Ovarienpaar (Tab. 8). Die Zunahme der Enzymaktivität ist somit korreliert mit der Eireifung.

Ausbleibende Kopulation führt bei verschiedenen Insektenarten zu einer verminderten Fekundität (Chen, 1971). Die reifen Eier werden zurückgehalten und verspätet und in geringer Anzahl abgelegt. Dieser Zustand drückt sich im doppelt so hohen Proteingehalt von Ovarien unbefruchteter Weibchen aus (Tab. 11). Die AAT-Aktivität ist ebenfalls um das Doppelte erhöht. Dies kann damit erklärt werden, dass ein Teil der AAT in den reifen, zurückgehaltenen

Eiern lokalisiert ist.

Schwierig ist die Erklärung für die erhöhte AAT-Aktivität im Fettkörper unbefruchteter 12- und 15-tägiger Weibchen, da der Einfluss der Kopulation auf den Fettkörper von *Drosophila* nicht bekannt ist. Baumann (1974) postulierte folgende Wirkung der Begattung auf die Proteinsynthese im Fettkörper und im Ovar von *Drosophila funebris*: Die von ihm isolierte Paragonien-substanz PS-2, die bei der Begattung ins Weibchen übertragen wird, wirkt auf das Gehirn, wodurch dieses wiederum die Proteinsynthese im Ovar direkt (hormonal) und im Fettkörper indirekt (vermutlich über die *Corpora allata*) stimuliert. Bleibt die Begattung aus, fällt die Proteinsynthese im Ovar auf ein minimales Niveau. Ähnlich könnte der Fettkörper reagieren. Möglicherweise steht die erhöhte AAT-Aktivität damit in Zusammenhang, dass bei geringer Proteinsynthese der Aminosäurepool vermehrt zur Energiegewinnung herbeigezogen wird.

Die AAT-Aktivität im Kopf beträgt etwa 10 % derjenigen des ganzen Tieres. Chen und Widmer (1968) wiesen im larvalen Gehirn von *Drosophila melanogaster* die Synthese von *L*-Aminobuttersäure durch Decarboxylierung von Glutaminsäure nach. Beide Substanzen wirken als Neurotransmitter. Es ist anzunehmen, dass die AAT-Aktivität im Kopf adulter Tier mit der Synthese dieser Neurotransmitter zusammenhängt.

Besonders hohe AAT-Aktivität wurde im Mitteldarm von 6-tägigen Larven gefunden. Da die Nahrungsaufnahme und damit die Reservebildung für die Verpuppung und die Metamorphose im Mittelpunkt dieses Larvalstadiums steht, muss die hohe Aktivität mit der starken Resorptionstätigkeit in Zusammenhang stehen. Murdock und Koidl (1972) injizierten ^{14}C -L-Alanin in den Darm von *Locusta*. Der grösste Teil der Radioaktivität wurde als $^{14}\text{CO}_2$ und ^{14}C -L-Glutamin wieder gefunden. Die Autoren zeigten, weiter, dass Alanin unter Beteiligung der AAT in Metaboliten des Krebszyklus umgewandelt wird. Die dabei entstehende Glutaminsäure dient als Akzeptor für Aminostickstoff. Der Darm nützt also die durch die Nahrung aufgenommene Aminosäure Alanin direkt zur Deckung seines Energiebedarfes.

V. Zusammenfassung

1. Aus *Drosophila nigromelanica* wurde die cytoplasmatische L-Alanin-Aminotransferase (E.C. 2.6.1.2.) isoliert. Die spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms betrug 485 U/mg Protein, was einer 1200-fachen Anreicherung entsprach. Die elektrophoretischen Untersuchungen ergaben einen hohen Reinheitsgrad.
2. Es wurde nur eine native Form des Enzyms gefunden. Mittels Gelfiltration wurde das Molekulargewicht auf 113'000, mittels SDS-Gelelektrophorese auf 56'000 berechnet. Das native Enzym besteht demnach aus 2 Untereinheiten mit gleichem Molekulargewicht.
3. Die Kinetik der Transaminierung wurde in beiden Reaktionsrichtungen untersucht. Die erhaltenen Resultate sind vereinbar mit dem für die Transaminierung allgemein akzeptierten Ping-Pong-Mechanismus.
4. Die absoluten Michaelis-Konstanten für L-Alanin, L-Ketoglutaratsäure, L-Glutaminsäure und Pyruvat betragen 5,2 mM, 0,43 mM, 14 mM und 0,25 mM.
5. Die Transaminierungsreaktion wurde in Gegenwart der Produktamino-säuren, der Substratanaloga Maleinsäure und L-Aminobuttersäure, p-Chloromercuribenzoessäure und verschiedener Aminosäuren, die nicht als Substrat dienen, untersucht. Die Resultate sprechen dafür, dass die L-Alanin-Aminotransferase von *Drosophila* sehr ähnliche Eigenschaften aufweist wie die bisher untersuchten Enzyme von Säugetieren.
6. Die L-Alanin-Aminotransferasenaktivität wurde während der Entwicklung von *Drosophila nigromelanica* in ganzen Tieren, in Kopf, Thorax und Abdomen, sowie in Ovar, Hoden, Fettkörper und Mitteldarm untersucht.
7. In allen untersuchten Geweben wurde Enzymaktivität gefunden. Im Thorax und im Fettkörper war der grösste Teil der Aktivität lokalisiert.

8. Die Gesamtaktivität erreichte im Larvalstadium ein erstes Maximum vor der Verpuppung und fiel während des Puppenstadiums auf ein Minimum. Kurz vor bis 6 Tage nach dem Schlüpfen erfolgte wieder ein starker Anstieg der Aktivität.
9. In Hoden und Ovarien nahm die Aktivität während der ersten 6 Tage nach dem Schlüpfen stark zu. Diese Zunahme scheint mit der Spermio- bzw. Oogenese korreliert zu sein.
10. Ovarien von 9 - 15-tägigen und Fettkörper von 12 - 15-tägigen virginellen Weibchen wiesen im Vergleich mit entsprechenden begatteten Tieren eine doppelt so hohe Aktivität pro Organ auf.
11. Die Resultate werden im Zusammenhang mit der physiologischen Bedeutung der L-Alanin-Aminotransferase bei Säugern und Insekten diskutiert.

VI. Literaturverzeichnis

- Andrews, P. (1970). Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration. In *Methods of Biochemical Analysis*, 18, 1.
- Baumann, H. (1974). Die Paragoniensubstanzen von *Drosophila funebris*: Isolation, Struktur, Biosynthese und Wirkung. Dissertation an der Universität Zürich.
- Belzecka, K., Raczyńska-Bojanowska, K. and Heller, J. (1959). Transamination in insects. I. Aspartic- α -ketoglutaric acid transaminase in *Celerio euphorbiae*. *Acta Biochem. polon.*, 6, 195.
- Braunstein, A. E. (1960). Pyridoxal phosphate. In *The Enzymes* (Eds. Boyer P. D., Lardy H. and Myrback K.), 2, 133. Academic Press, New York.
- Bulos, B. and Handler, P. (1965). Kinetics of beef heart glutamic-alanine transaminase. *J. biol. Chem.* 240, 3283.
- Bursell, E. (1963). Aspects of the metabolism of amino acids in the tsetse fly, *Glossina* (Diptera). *J. Insect Physiol.* 9, 439.
- Bursell, E. (1977). Synthesis of proline by fat body of the tsetse fly (*Glossina moritans*): Metabolic pathways. *Insect Biochem.*, 7, 434.
- Bursell, E. and Slack, E. (1976). Oxidation of proline by sarcosomes of the tsetse fly, *Glossina moritans*. *Insect Biochem.*, 6, 159.
- Chen, P. J. (1966). Amino acid and protein metabolism in insect development. *Adv. Insect Physiol.*, 3, 53. Academic Press.
- Chen, P. J. (1971). Biochemical aspects of insect development. In *Monographs in Developmental Biology* (Ed. by Wolsky, A.) 3, Karger, Basel.

- Chen, P. S. and Bachmann-Diem, C. (1964). Studies on the transamination reactions in the larval fat body of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, 10, 819.
- Chen, P. S. and Baker, G. T. (1976). L-alanine aminotransferase in the paragonial gland of *Drosophila*. *Insect Biochem.*, 6, 441.
- Chen, P. S. and Oechslin, A. (1976). Accumulation of glutamic acid in the paragonial gland of *Drosophila nigro-melanica*. *J. Insect Physiol.*, 22, 1237.
- Chen, P. S. and Widmer, B. (1968). Content and synthesis of γ -aminobutyric acid in the larval brain of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* 24, 516.
- Cleland, W. W. (1963). The kinetics of enzyme catalysed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 104.
- Cleland, W. W. (1963). The kinetics of enzyme catalysed reactions with two or more substrates or products. II. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection. *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 138.
- Crabtree, B. and Newsholme, E. A. (1970). The activities of proline dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, aspartate-oxoglutarate aminotransferase in some insect flight muscle. *Biochem. J.*, 117, 1019.
- Davis, B. J. (1964). Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. *Ann. N. Y. Sci.* 121, 404.
- De Rosa, G. and Swick, R. W. (1975). Metabolic implications of the distribution of the alanine aminotransferase isozymes. *J. biol. Chem.* 250, 7961.

- Desai, R. M. and Kilby, B. A. (1958). Some aspects of nitrogen metabolism in the fat body of the larva of *Calliphora erythrocephala*. Arch. int. Physiol. Biochim. 66, 248.
- Donnellan, J. F., Jenner, D. W. and Ramsey, A. (1974). Subcellular fractionation of fleshfly flight muscle in attempts to isolate synaptosomes and to establish the location of glutamate enzymes. Insect Biochem., 4, 243.
- Eggstein, M. und Kreutz, F. H. (1955). Vergleichende Untersuchungen zur qualitativen Eiweissbestimmung im Liquor und in eiweissarmen Lösungen. Klin. Wschr. 33, 879.
- Fasella, P. and Turano, C. (1970). Structure and catalytic role of the functional groups of aspartate aminotransferase. In Vitam. Horm. (Eds. Harris, R. S., Munson, P. L. and Diczfalasy, E.), 28, 157.
- Florini, J. R. and Vestling, C. S. (1957). Graphical determination of the dissociation constants for two substrate enzyme systems. Biochim. Biophys. Acta 25, 575.
- Gatehouse, P. W., Hopper, S., Schatz, L. and Segal, H. (1967). Further characterisation of L-alanine aminotransferase of rat liver. J. biol. Chem. 242, 2319.
- Geer, B. W., Kelly, K. R., Pohlman, T. H. and Yemm, S. J. (1975). A comparison of rat and *Drosophila* spermatozoan metabolisms. Comp. Biochem. Physiol., 50B, 41.
- Geer, B. W., Martensen, D. W., Downing, B. C. and Muzyka, G. S. (1972). Metabolic changes during spermatogenesis and thoracic tissue maturation in *Drosophila hydei*. Devel. Biol., 28, 390.
- Geer, B. W. and Zacharias, C. E. (1974). Alteration of L-alanine aminotransferase and β -hydroxyacyl dehydrogenase activities in *Drosophila melanogaster* larvae by nutritional manipulation. Comp. Biochem. Physiol., 47, 53.

- Gilbert, L. I. (1967). Biochemical correlation in insect metamorphosis. *Comp. Biochemistry* 28, 199.
- Grein, L. und Pfeleiderer, G. (1958). Ueber die Glutamat-Pyruvat-Transaminase aus Schweineherzen. *Biochem. Z.*, 330, 433.
- Hopper S. and Segal, H.L. (1962). Kinetic studies of rat liver glutamic-alanine aminotransferase. *J. biol. Chem.* 237, 3189.
- Horecker B. L. and Kornberg A. (1948). The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *J. biol. Chem* 175, 385.
- Jenkins W.T. and Saier, M. (1970). L-Alanine aminotransferase (pig heart). In *Methods in Enzymology - Metabolism of Amino Acids and Amines* (Eds. Tabor, H. and Tabor, C.W.) 17 A, 159. Academic Press, New York.
- Kilby, B. A. (1963). The biochemistry of the insect fat body. *Adv. Insect Physiol.* 1, 111.
- Kilby B. A. and Neville, E. (1957). Amino acid metabolism in locust tissues. *J. exp. Biol.* 34, 276.
- Katunuma, N., Mikumo, K., Matsuda, M. and Mitsuko, O. (1962). Differences between the transaminases in mitochondria and soluble fraction. *J. Vitam.* 8, 68.
- Katunuma N., Okada, M., Katsunuma, T, Fujino, A. and Matsuzawa, T. (1968). Different metabolic rates of transaminase isozymes. In *Pyridoxal Catalysis: Enzymes and model systems* (Eds. Snell, E. E., Braunstein, A. E., Severin, E. S. and Torchinsky, Y.M.). Interscience publishers. New York.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T_4 . *Nature* 227, 681.
- Lineweaver, H. and Burk, D. (1934). Determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193, 265.
- Mahler, H. R. and Cordes, E. H. (1971). *Biological chemistry*. Harper and Row, New York.
- Mane, S. D. and Mehrotra, K. N. (1976). Locust alanine aminotransferase has subunit structure. *Experientia* 32, 154.
- Mane, S. D. and Mehrotra, K. N. (1977). Alanine aminotransferase: Properties and distribution in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem.*, 7, 419.
- Matsuzawa, T. and Segal, H. L. (1968). Rat liver alanine aminotransferase. Crystallization, composition and role of sulfhydryl groups. *J. biol. Chem.* 243, 5929.
- McAllen, J. W. and Chefurka, W. (1961 a). Some physiological aspects of glutamate-aspartate transamination in insects. *Comp. Biochem. Physiol.*, 2, 290.
- McAllen, J. W. and Chefurka, W. (1961 b). Properties of transaminases and glutamic dehydrogenase in the cockroach, *Periplaneta americana*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 3, 1.
- Meister, A. (1965). *Biochemistry of amino acids*. Academic Press, New York.
- Murdock, L. L. and Koidl, B. (1972). Limited permeability and metabolism of L-glutamate in the locust gut wall. *J. exp. Biol.* 56, 781.
- Pette, D. and Luh, W. (1962). Constant proportion groups of multicoated enzymes. *Biochim. biophys. Res. Commun.* 8, 283.
- Saier, M. H. and Jenkins, T. W. (1967 a). Alanine aminotransferase. I. Purification and properties. *J. biol. Chem.* 242, 91.

- Saier, M. H. and Jenkins, T. W. (1967 b). Alanine aminotransferase. II. The basis for substrate specificity. *J. biol. Chem.* 242, 101.
- Sacktor, B. (1974). Biological oxidation and energetics in insect mitochondria. In *The physiology of insecta* (Ed. Rockstein, M.), 4, 237.
- Sacktor, B. and Childress, C. C. (1967). Metabolism of proline in insect flight muscle and its significance in stimulating the oxidation of pyruvate. *Arch. Biochem. Biophys.* 120, 583.
- Segal, H. L., Beattie, D. L. and Hopper, S. (1962). Purification and properties of glutamic-alanine transaminase from normal and corticoid rats. *J. biol. Chem.* 241, 4391.
- Segal, H. L. and Matsuzawa, T. (1970). L-alanine aminotransferase (rat liver). In *Methods in Enzymology - Metabolism of Amino Acids and Amines* (Eds. Tabor, H. and Tabor, C. W.), 17 A, 153. Academic Press, New York.
- Snell, K. (1979). Alanine as a gluconeogenic carrier. *TIBS* 4, 124.
- Storey, K. B. and Bailey, E. (1978). Intracellular distribution of enzymes associated with lipogenesis and gluconeogenesis in fat body of the adult cockroach, *Periplaneta*. *Insect Biochem.* 8, 125.
- Swick, R. W., Bornstein, P. L. and Slange, J. L. (1965 a). The metabolism of mitochondrial proteins. I. Distribution and characterisation of the isozymes of alanine aminotransferase in rat liver. *J. biol. Chem.* 240, 3334.
- Swick, R. W., Bornstein, P. L. and Slange, J. L. (1965 b). The metabolism of mitochondrial proteins. II. The response of the isozymes of alanine aminotransferase to diet and hormones. *J. biol. Chem.* 240, 3341.

- Vevlick, S. F. and Vavra, J. (1962). A kinetic and equilibrium analysis of the glutamic-oxaloacetate transaminase mechanism. *J. biol. Chem.* 237, 2109.
- Weber K. and Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. biol. Chem.* 237, 2109.
- Wigglesworth, V. B. (1942). The storage of protein, fat , glycogen and uric acid in the fat body and other tissues of mosquito larvae. *J. exp. Biol.* 19, 56.
- Wyatt, G. R. (1975). Regulation of protein and carbohydrate metabolism in insect fat body. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 1974, 209.

Curriculum vitae

Als Bürger von Basel wurde ich, Max Robert Schneider, am 1. 1. 1950 in Kreuzlingen (TG) geboren. 1965 trat ich in das Lehrerseminar Kreuzlingen ein, das ich 1970 mit dem kantonalen Primarlehrerpatent verliess. Im Sommersemester 1970 immatrikulierte ich mich an der philosophischen Fakultät II der Universität Zürich. 1976 erwarb ich das Diplom als Naturwissenschaftler. Im gleichen Jahr begann ich meine Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. P. S. Chen, bei dem ich von 1973 - 1979 auch als Assistent tätig war.

Vorlesungen und Kurse besuchte ich bei folgenden Damen und Herren Dozenten: Bachofen, Batschelet, Biegert, Billeter, Birnstiel, Burla, Chen, Christen, Claude, Cook, Dübendorfer, Dütsch, Egger, Endress, Eugster, Fritz-Niggli, Hadorn, Hediger, Hohl, Humbel, Hunsperger, Jungen, Jungen-Hauschteck, Kägi, Kubik, Kubli, Kummer, Leuthardt, Martz, de Mendoza-Heuer, Nöthiger, Oswald, Rast, Rohweder, Sauter, Schlittler, Schmid H., Schmid W., Sträuli, Tardent, van der Waerden, Wanner, Wehner, Weissmann, Wyler, Ziswiler.

